

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**SIĞIRLARDA *BABESIA* TÜRLERİNİN REVERSE LINE
BLOTTING, NESTED PCR VE REAL TIME PCR TEKNİKLERİ
İLE KARŞILAŞTIRMALI TANISI**

Proje No: TSA-10-2874

Proje Türü
Normal Araştırma Projesi (NAP)

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Alparslan YILDIRIM
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD

Prof. Dr. Abdullah İNCİ
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD

Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD

Nisan 2011

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Araştırmacılar, bu çalışmaya TSA-10-2874 kod numaralı proje ile maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederler.

SİĞIRLARDA *BABESIA* TÜRLERİNİN REVERSE LINE BLOTTING, NESTED PCR VE REAL TIME PCR TEKNİKLERİ İLE KARŞILAŞTIRMALI TANISI

ÖZET

Bu çalışma, sığırlarda *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın Reverse Line Blotting (RLB), Nested PCR ve Real Time PCR teknikleri ile karşılaştırmalı teşhisi amacıyla planlanmıştır. Türkiye'nin farklı illerindeki sığırlardan çeşitli zamanlarda toplanan toplam 400 adet kan örneği çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Kan örneklerinden genomik DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'lar RLB, Nested PCR ve Real Time PCR teknikleri ile analiz edilmiştir. İncelemesi yapılan 400 sığır kan örneğinin RLB sonuçlarına göre toplam 18'inin (%4,50) *B. bovis*, 59'unun (%14,75) *B. bigemina*, 16'sının (%4,00) *Babesia* sp. ve 2'sinin (%0,50) *B. bovis* ve *B. bigemina* ile miks enfekte olduğu belirlenmiştir. Nested PCR ile 23'ünün (%5,75) *B. bovis*, 71'inin (%17,75) *B. bigemina* ve 7'sinin (%1,75) *B. bovis* + *B. bigemina* miks; Real Time PCR ile 23'ünün (%5,75) *B. bovis*, 75'inin (%18,75) *B. bigemina* ve 9'unun (%2,00) ise *B. bovis* + *B. bigemina* miks enfeksiyon saptanmıştır. Testlerin sensitivite ve spesifitelerinin belirlenmesinde gold test Real Time PCR olarak alınmıştır. Nested PCR tekniğinin Real Time PCR tekniği ile kıyaslanması sonucu %94,4 sensitivite ve %100,0 spesifite; RLB tekniğinin ise %88,8 sensitivite ve %100,0 spesifite gösterdiği belirlenmiştir. Kappa testi ile Real Time PCR ve Nested PCR arasında %96,1, Real Time PCR ve RLB arasında %92,1 ve Nested PCR ile RLB arasında ise %95,9 oranında uyum olduğu saptanmıştır. RLB testinde *Babesia* sp. olarak belirlenen 16 örneğin hem Real Time hem de Nested PCR'da 5'inin *B. bigemina*, 9'unun *B. bovis*, 2'sinin ise *B. bovis* + *B. bigemina* miks olduğu ortaya konmuştur.

Sonuç olarak bu çalışma ile sığırlarda *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın araştırılmasında Real Time PCR yönteminin Nested PCR ve RLB tekniklerine oranla daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında her üç tekniğin de bu enfeksiyonların teşhisinde oldukça spesifik olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Babesia, Sığır, Nested PCR, Revers line blotting, Real Time PCR

COMPERATIVE DIAGNOSIS OF BOVINE *BABESIA* SPECIES BY REVERSE LINE BLOTTING, NESTED PCR AND REAL TIME PCR TECHNIQUES

ABSTRACT

This study was carried out to comparative diagnosis of *B. bovis* and *B. bigemina* by Reverse Line Blotting (RLB), Nested PCR and Real Time PCR techniques. Totally, 400 blood samples collected from cattle at different times from various provinces of Turkey were constituted the material of the study. Genomic DNA extraction was performed to the blood samples. The obtained DNA's were analyzed by (RLB), Nested PCR and Real Time PCR techniques. Totally 18 (4.50%), 59 (14.75%), 16 (4.00%) and 2 (0.50%) of the 400 bovine blood samples were found to be infected with *B. bovis*, *B. bigemina*, *Babesia* sp. and *B. bovis* + *B. bigemina* mix, respectively by RLB. 23 (5.75%), 71 (17.75%) and 7 (1.75%) of the examined samples were found to be infected with *B. bovis*, *B. bigemina* and *B. bovis* + *B. bigemina* mix, respectively by Nested PCR whereas, 23 (5.75%), 75 (18.75%) and 9 (2.00%) were found to be infected with *B. bovis*, *B. bigemina* and *B. bovis* + *B. bigemina* mix, respectively by Real Time PCR. Real Time PCR was used as a gold test in the determination of the sensitivity and specificity of the tests. 94.4% and 88.8% sensitivity and both 100.0% specificity were determined when compared Nested PCR and RLB with Real Time PCR, respectively. Kappa test revealed that 96.1% 92.1% and 95.9% consistence between Real Time PCR and Nested PCR, Real Time PCR and RLB, Nested PCR and RLB, respectively. Totally 16 *Babesia* sp. positivity's in RLB test, 5, 9 and 2 samples were determined as *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. bovis* + *B. bigemina* mix, respectively by both Real Time and Nested PCR.

In conclusion, Real Time PCR technique was found to be more sensitive than Nested PCR and RLB techniques in the investigation of *B. bovis* and *B. bigemina* in cattle with this study. In addition, each technique was determined to be highly specific in the diagnosis of these infections.

Keywords: Babesia, Cattle, Nested PCR, Revers line blotting, Real Time PCR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
TEŞEKKÜR	3
ÖZET	4
ABSTRACT	5
İÇİNDEKİLER	6
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	8
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	9
2. GENEL BİLGİLER	11
2.1. BABESIOSIS'IN TANIMI VE TARİHÇESİ.....	11
2.2. <i>BABESIA</i> TÜRLERİNİN SINIFLANDIRMADAKİ YER	12
2.3. <i>BABESIA</i> TÜRLERİNİN HAYAT SİKLUSU.....	13
2.3.1. Omurgalı Konakta Gelişme	14
2.3.2. Vektör Kenede Gelişim	14
2.4. SIĞIRLARDAKİ <i>BABESIA</i> TÜRLERİ	16
2.4.1. <i>Babesia bigemina</i> (Smith ve Kilborne, 1893).....	16
2.4.1.1. Yayılış ve Epidemiyoloji	16
2.4.1.2. Gelişme	18
2.4.1.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler	19
2.4.2. <i>Babesia bovis</i> (Babes 1888, Starcovici, 1893).....	20
2.4.2.1. Yayılış ve Epidemiyoloji	21
2.4.2.2. Gelişme	22
2.4.2.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler	22
2.4.2.4. Zoonotik Önemi.....	22
2.4.3. <i>Babesia divergens</i> (M'Fadyean and Stockman, 1911).....	22
2.4.3.1. Yayılış ve Epidemiyoloji	23
2.4.3.2. Gelişme	23
2.4.3.3. Zoonotik Önemi.....	23
2.4.4. <i>Babesia major</i> (Sergent,Donatien, ParrotiLestoquard and Plantureux,1926) ...	23
2.4.4.1. Yayılış ve Epidemiyoloji	23
2.4.4.2. Gelişme	24
2.4.4.3. Zoonotik Önemi.....	24
2.4.5. <i>Babesia jakimovi</i>	24
2.4.6. <i>Babesia occultans</i>	24
2.4.7. <i>Babesia ovate</i>	24

	<u>Sayfa no</u>
2.5. BABESIOSIS'TE TEŞHİS	24
2.5.1. Mikroskopik Muayene	25
2.5.2. Serolojik Testler	26
2.5.3. Moleküler Teknikler.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. HAYVAN MATERYALİ (SIĞIRLAR) VE KAN ÖRNEKLERİ	30
3.2. LABORATUAR ÇALIŞMALARI	30
3.2.1. DNA Ekstraksiyonu	30
3.2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR) ve Jel Elektroforez	31
3.2.3. Reverse Line Blotting (RLB)	33
3.2.4. Nested-PCR.....	35
3.2.5. Real Time-PCR	36
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	38
4. BULGULAR	39
4.1 RLB SONUÇLARI	39
4.2. NESTED PCR SONUÇLARI	40
4.3. REAL TIME PCR SONUÇLARI	41
4.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	49
6. KAYNAKLAR	55

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 3.1. Kan örneklerinin alındığı iller ve örneklerin dağılımı.....	30
Tablo 3.2. RLB testi amacıyla yapılan PCR'da kullanılan primerler	31
Tablo 3.3. PCR reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları	32
Tablo 3.4. PCR amplifikasyonu için thermal profil	32
Tablo 3.5. RLB Problarının Sekans Dizilimleri	33
Tablo 3.6. Nested-PCR'da Kullanılan Primerler	35
Tablo 3.7. Real Time PCR'da Kullanılan Primer ve Problar	37
Tablo 4.1. İncelemesi yapılan sığırlarda Nested PCR, RLB ve Real Time PCR yöntemlerine göre belirlenen Babesia pozitifliklerinin dağılımı	45
Tablo 4.2. Babesiosis'in teşhisinde kullanılan tekniklerin Gold Teste göre sensitivite ve spesifiteleri	48
Şekil 2.1. Babesia ve Theileria türlerinin 18SrRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (7).	13
Şekil 4.1. Sığır piroplazm türlerinin 18S rRNA gen bölgesinden ~390-430 bp'lik bölgenin amplifikasyonunun jel elektroforezde görünümü	39
Şekil 4.2. RLB sonuçlarının görüntüsü.....	40
Şekil 4.3. Nested PCR analizinin 1. PCR basamağında pozitif belirlenen örneklerin agaroz jel üzerindeki görünümü	40
Şekil 4.4. Nested PCR analizinin 2. PCR basamağında B. bovis pozitif belirlenen örneklerin agaroz jel üzerindeki görünümü.....	41
Şekil 4.5. Nested PCR analizinin 2. PCR basamağında B. bigemina pozitif belirlenen örneklerin agaroz jel üzerindeki görünümü.....	41
Şekil 4.6. Sybergreen Real Time PCR analizleri sonucu B. bovis pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon grafikleri.....	42
Şekil 4.7. Sybergreen Real Time PCR analizleri sonucu B. bovis pozitif saptanan örneklerin erime eğrileri (melting curve); T _m =78,1	42
Şekil 4.8. TaqMan Prob bazlı Real Time PCR analizleri sonucu B. bigemina pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon eğrileri.	43
Şekil 4.9. Real Time PCR'da B. bigemina pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı	43
Şekil 4.10. Real Time PCR'da B. bovis pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı	44
Şekil 4.11. B. bigemina'nın Rap1 gen bölgesinden dizayn edilen primerler ve probun, GenBank'a kayıtlı diğer B. bigemina sekans dizileri ile multible alignmentları ...	47

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Subtropikal iklim kuşağında yer alan Türkiye’de hayvancılık, ekonomik açıdan çok önemli bir yere sahiptir. Türkiye’de hayvancılığın gelişmesini olumsuz yönde etkileyen barınak, bakım ve besleme gibi yetiştiricilik hatalarının yanında, bakteriyel, viral ve paraziter orijinli hastalıklar oldukça önem arz etmektedir. Paraziter hastalıklar içerisinde yaygın olanlardan biri de oldukça önemli bir protozoon hastalığı olan babesiosis’tir. Türkiye’ye ithal edilen kültür ırkı sığırlar ve bunların melezleri babesiosis’e karşı oldukça duyarlı ve bu hastalığın tehditi altındadırlar. Hastalık, özellikle kültür ırklarında yüksek oranda ölümlere yol açmaktadır. Ayrıca et ve süt verimlerinde önemli ölçülerde düşüşlere de neden olan babesiosis, dolayısıyla Türkiye ekonomisine önemli oranda zarar vermektedir.

Babesiosis; tropik ve subtropik iklim kuşağındaki evcil ve yabani memeli hayvanlar ile insanlarda da görülen ve vektör kenelerle transovarial ve transstadial olarak nakledilen zoonotik karakterli bir hastalıktır. Hastalık özellikle yaz aylarında vektör kenelerin aktifleşmesiyle birlikte yüksek ateş, anemi, anoreksi, kaşeksi, hemoglobinüri, hipotansif şok ile seyretmekte ve ölümlere neden olmaktadır. Önceleri sadece memeli hayvanların bir hastalığı olarak bilinen babesiosisin son 35 yıldır insanlar için de önemli bir hastalık olduğu bildirilmiştir. Bugüne kadar insanlarda *Babesia microti*, *B. divergens*, *B. bovis*, *B. canis*, *B. duncani* (WA1), *B. venatorum* (EU1) türleri ile MO1 ve KO1 suşlarının babesiosis’e sebep olduğu rapor edilmiştir.

Halk arasında "Ağrıma, Ağrık, Sarılık" gibi isimlerle bilinen babesiosis’in teşhisinde klinik semptomların yanında, mevsim, kene enfestasyonu, unstabil bölge gibi epidemiyolojik veriler de şüpheleri artırabilmektedir. Ancak hastalığın teşhisi, perifer kandan yapılmış ve Giemsa ile boyanmış preparatların mikroskopik incelenmesinde eritrositler içerisinde parazitin görülmesiyle olur. Hastalığa hangi türün yol açtığını belirlemek için ise, parazite karşı oluşan spesifik antikorların serolojik yöntemlerle (IFAT, ELISA, IHA vb.) saptanması veya parazit DNA’sının moleküler yöntemlerle (PCR, RLB, Nested-PCR, Real-Time PCR vb.) tespit edilmesi gerekir. Konvansiyonel ve serolojik yöntemlerin çeşitli dezavantajları sebebiyle, teşhiste daha özgül ve duyarlı yöntemlere gereksinim duyulmuştur. Bunun sonucu olarak son yıllarda parazit DNA’sından teşhise yönelik ileri teknolojik moleküler yöntemler yaygın olarak

kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemler arasında Nested PCR, Reverse Line Blotting (RLB) ve son yıllarda Real Time PCR yöntemleri, duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olması sebebiyle öne çıkmıştır. Sığırlarda babesiosis'in Türkiye'deki durumu hakkında yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğunu mikroskopik ve serolojik çalışmalar oluşturmaktadır. Moleküler çalışmaların sayısı ise oldukça sınırlı olup sybergreen veya prob bazlı Real Time PCR ile ilgili çalışma bu güne kadar bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, Türkiye'nin çeşitli yörelerindeki sığırlardan toplanmış ve Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Cryo-Bank'ında muhafaza edilen EDTA'lı kanlarda sığır babesiosis'inin en yaygın ve önemli iki türü olan *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın Nested PCR, Reverse Line Blotting (RLB) ve Real Time PCR yöntemleri ile karşılaştırmalı teşhisi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BABESIOSIS'İN TANIMI VE TARİHÇESİ

Babesiosis; Apicomplexa anaç altındaki *Babesia* türlerinin meydana getirdiği, tropik ve subtropik bölgelerdeki evcil ve yabani hayvanlar ile insanlarda da görülen, *Ixodidae* ailesine bağlı vektör keneler tarafından transovarial ve transstadial olarak nakledilen zoonotik karakterli bir protozoer hastalıktır. Hastalıkla ilgili ilk bilgiler, 19. yüzyılın sonlarında ortaya çıkmıştır. İlk defa 1888 yılında Romanya’da, sığırlarda görülen ve hızla yayılan bir hastalığın sebebinin ne olduğunun araştırılması amacıyla Romanya Hükümeti tarafından görevlendirilen Victor Babes sığır eritrositleri içerisinde birtakım mikroorganizmler keşfetmiş ve bunların “sığır hemaglobinürisi” ile bağlantısı olduğunu ileri sürmüştür. Babes, daha sonra aynı mikroorganizmleri koyun eritrositlerinde de gözlemlemiştir. Diğer yandan Amerika Birleşik Devletleri’nde 1893’de Smith ve Kilborne “Texas Fever” olarak adlandırılan hastalıkta, eritrositler içindeki etkeni, *Pyrosoma bigeminum* olarak isimlendirmişler ve bunun bir kene tarafından nakledildiğini de keşfetmişlerdir. Aynı yıl Starcovici, bu parazitlere sırasıyla *Babesia bovis*, *B. ovis* ve *B. bigemina* isimlerini vermiştir (1, 2). Diğer yandan “Texas Fever” (babesiosis) etkeni *Pyrosoma bigeminum* (*Babesia bigemina*)’un vektör kene *Boophilus annulatus* tarafından sığırlara nakledildiğinin yayınlanmasından sonra babesiosis, dünyanın çeşitli bölgelerinde de keşfedilmiştir. Avustralya’da Dr. Sidney Hunt babesiosis’i (bovine redwater), “Texas fever”ın identifiği olarak konfirme etmiştir. Arjantin’de, 1903’te Lignieres sığır babesiosisi (Tristeza) için form A ve form C olmak üzere iki form tarif etmiş olup bunlardan birinin Smith ve Kilborne’un tanımladığına benzer şekilde büyük, diğerinin ise daha küçük intraeritrositik etkenler olduğunu bildirmiştir. Aynı araştırmacı, küçük olan etkenin, genellikle kan frotilerinde zor görülmesine karşın, böbrek ve merkezi sinir sisteminin meningeslerindeki kapillarlardan yapılan frotilerde daha kolay tespit edilebildiğini bildirmiş, 1910 yılında bu küçük organizmaları önce *Piroplasma argentina* daha sonra *Babesia argentina* olarak isimlendirmiştir. *Babesia argentina* ismi Avusturalya ile Güney ve Orta Amerika’da uzun yıllar kullanılmıştır. Bu durum 1970’li yılların ortalarına kadar sürmüş, *B. argentina* ile *B. bovis*’in aynı özelliklere sahip olduğu anlaşılmış ve isimlendirmede *B. bovis*’in kullanımının daha uygun olacağı kabul edilmiştir (1, 2). M’Fadyean ve

Stockman 1911’de İngiltere’de yine sığırlarda genellikle eritrositin periferinde yer alan etkenler tespit etmişler ve bunları önce *Piroplasma divergens* daha sonra *Babesia divergens* olarak isimlendirmişlerdir (1, 2). Yine aynı araştırmacılar 1911 yılında *B. bigemina*’ya benzer büyük bir etkenin bulunduğunu bildirmişler, daha sonra Sergent ve arkadaşları 1926 yılında bu etkeni *B. major* olarak adlandırmışlardır (1, 2). Brocklesby 1976 yılında sığırlarda babesiosis etkenlerinden *B. bigemina*, *B. major*, *B. bovis* ve *B. divergens*’in önemli olduğunu bildirmiştir. Sığırlardaki *Babesia* türlerinin 1960’lı yılların sonlarında Hoyte ve 1976 yılında Brocklesby tarafından gözden geçirilmesini takiben, *B. bovis* (*B. argentina*; *B. berbara*; *B. colchica*), *B. bigemina*, *B. divergens* (*B. caucasica*; *B. occidentalis*; *B. karelica*) ve *B. major*’ün sığırlarda babesiosis’e yol açan başlıca türler oldukları kabul edilmiştir (3, 4).

Türkiye’de ilk babesiosis olgusu, Nicoll ve Adil Bey tarafından 1890’da sığırlarda tarif edilmiş, bunu Samuel ve Raif, İbrahim Ekrem, Lestoquard, Gören ve Yetkin, Aysoy’un çalışmaları izlemiştir. Takiben 1950-1980 arasında mikroskopik; 1980’li yılların sonunda mikroskopik bakının yanında serolojik; 2000’li yılların başlarında ise bunlara ilave nükleik asit tabanlı moleküler araştırmalar yapılmıştır (5).

2.2. BABESIA TÜRLERİNİN SINIFLANDIRMADAKİ YERİ

Babesia türlerinin Systema Naturae 2000’e göre sistematikteki yerleri aşağıdaki gibidir (6).

Biota (Canlılar)

Domain: **Eukaryota** Chatton, 1925

Kingdom: **Protozoa** (Goldfuss, 1818) R. Owen, 1858

Subkingdom: **Bicilialata**

İnfrakingdom: **Alveolata** Cavalier-Smith, 1991

Phylum: **Myzozoa** Cavalier-Smith ve Chao, 2004

Subphylum: **Apicomplexa** Levine, 1970

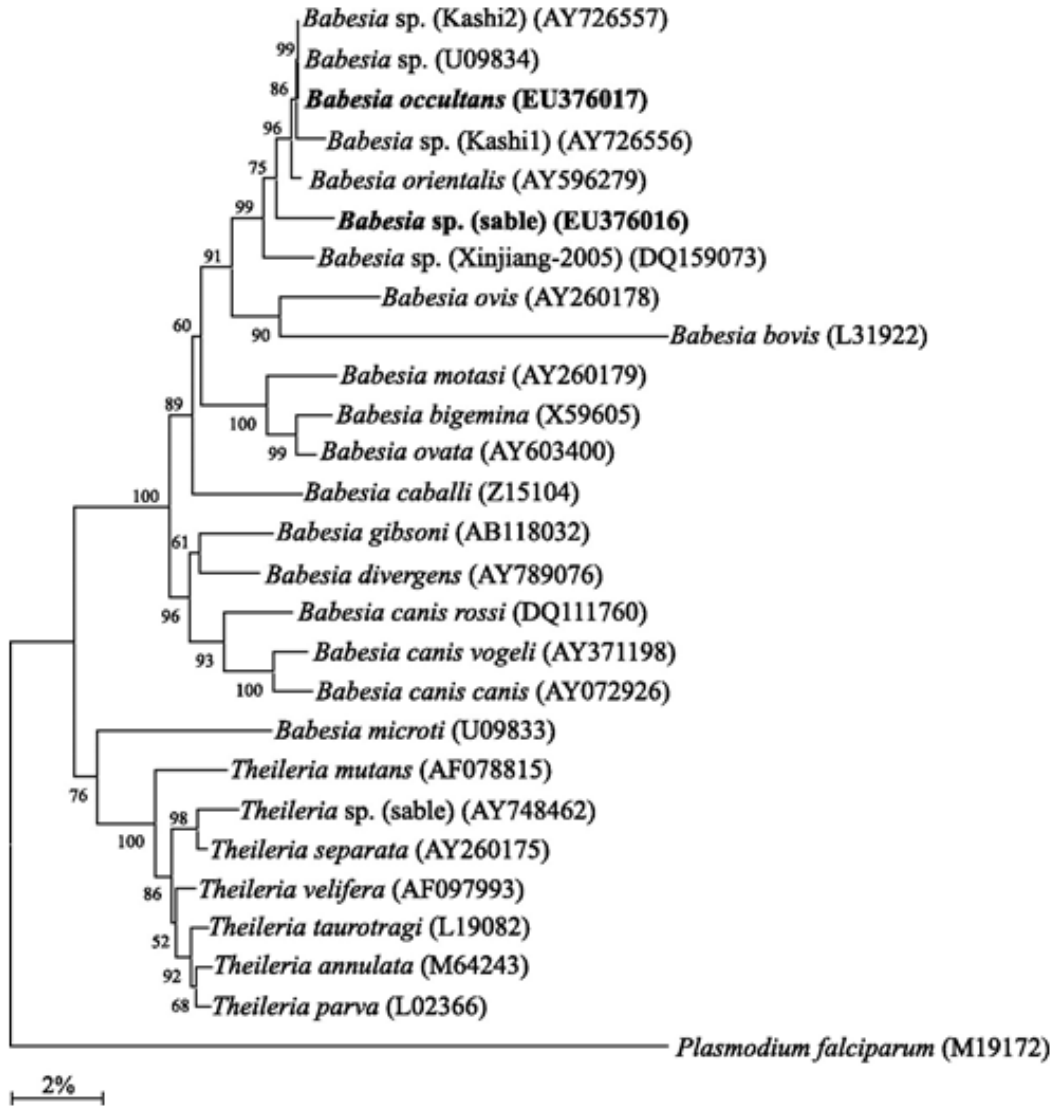
Class: **Aconoidasida** Mehlhorn, Peters ve Haberkorn, 1980

Order: **Piroplasmorida** Wenyon, 1926

Family: **Babesiidae** Poche, 1913

Genus: **Babesia** Starcovici, 1893

Son yıllarda moleküler olarak *Babesia* ve *Theileria* türlerinin sınıflandırılmasında 18S rRNA gen bölgelerine göre filogenetik akrabalık dereceleri esas alınarak da sınıflandırmalar yapılmaktadır (7) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *Babesia* ve *Theileria* türlerinin 18SrRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (7).

2.3. BABESIA TÜRLERİNİN HAYAT SİKLUSU

Babesia türleri, heteroksen gelişme gösteren protozoonlardır. Bu gelişme omurgalı konaklar ile *Ixodidae* ailesine bağlı kenelerde olmak üzere iki safhada gerçekleşir. *Babesia* türlerinin yaşam döngüleri genel olarak birbirine benzemektedir. Bütün *Babesia* türleri doğal olarak enfekte kenelerin konaklarından kan emmeleriyle

nakledilirler. Hayat sikluslarındaki başlıca farklılıklar, bazı *Babesia* türlerinde [gerçek (true) (=sensu stricto) *Babesia* spp.] ve gerçek olmayan (=sensu lato) *Babesia* (*B. microti*-benzeri, örn. *Theileria annae*)] transovaryal naklin varlığı ile ilgilidir (8-10).

2.3.1. Omurgalı Konakta Gelişme

Enfekte kene kan emmek için konağını soktuğunda sporozoitler, konağa enjekte olurlar ve doğrudan eritrositlere girerler. Bu sporozoitler ön kısımlarında polar halka, mikronemler ve roptriden oluşan apikal kompleksi ihtiva etmektedirler. *Babesia* sporozoitlerinin konak eritrositlerine giriş fenomeni, *Babesia* türlerini *Theileria* türlerinden ayırır. *Theileria* sporozoitleri, başlangıçta lenfositlere veya monositlere girerler ve orada şizogoni gelişimini tamamladıktan sonra merozoit olarak eritrositlere penetre olurlar (4). Konakta, enfekte eritrositler içerisindeki *Babesia* sporozoitleri, piroplazm (trofozoit) haline gelişirler. Trofozoitin olgunlaşması ile, sitoplazmada meydana gelen değişimler sonucunda, mikronem, roptri, subpelliküler mikrotubuller ve polar halka gibi apikal kompleks'i oluşturan yapılar tekrar meydana gelir. Olgunlaşan trofozoit, şizogoniye benzer şekilde ikiye bölünerek çoğalır (11-13). Bu bölünme sırasında parazitin yuvarlak, oval formdan, ameoboid ve armut formlarına kadar değişen şekilleri görülür ki, bunlara piroplasmik formlar da denilmektedir. Trofozoit ikiye veya dörde bölünerek kız hücreleri (merozoitler) meydana getirir. Mackenstedt ve ark. (14) *B. bigemina*'da, diploid DNA seviyesine sahip piroplaslardan farklı olarak "gamont prekürsörleri" adı verilen oval şekilli bir merozoit tanımlamışlardır. Bu gamont prekürsörleri, vektör kene tarafından alınıncaya kadar gelişmezler. Diğer yandan enfekte eritrositin parçalanması sonucu serbest kalan merozoitler, diğer sağlam eritrositlere girerek onları da enfekte ederler. Bu şekilde enfeksiyon ya konağın ölümüyle veya konağın direnç (immunité) kazanıp parazitleri temizlemesiyle sonuçlanır (15, 16).

2.3.2. Vektör Kenede Gelişim

Babesia türlerinin enfekte konaktan kan emen vektör kenede ve vertikal (transovarial) olarak enfekte doğan larvalarda çeşitli gelişim evreleri geçer. Vektör kenenin enfekte konağından emdiği kanın kenenin orta bağırsağına geçmesiyle değişiklikler başlar. Enfekte eritrositlerle alınan gamontlardan "strahlenkörper" adı verilen, çıkıntılı formda ışınal-cisimciklerinin (ray-bodies) iki popülasyonu oluşur (17). Daha sonra bunlar

eritrosit içerisinde çoğalmalarını sürdürür ve çoğalma, bunlar ortaya çıktıktan sonra da devam eder. Çok çekirdekli ışnsal cisimciklerin bir araya gelmesiyle büyük topluluklar oluşur. Bir kez bölünme olduğunda haploid sayıda tek çekirdekli ışnsal cisimcikler meydana gelir (14). Daha sonra bu yapıların bir çifti bir araya gelerek singami (17) yolu ile küresel hücre olarak da adlandırılan zigotu (13) oluştururlar. Oluşan zigot, kene bağırsağında tercihen sindirim hücrelerini enfekte eder. Muhtemelen burada çoğaldıktan sonra, vitellojen sentezleyen bazofilik hücrelere yerleşir. Burada daha fazla bölünmeyle hareket kabiliyetli ookinetler (vermiküller, sporokinetler) meydana gelir. Daha sonra kinetler, buradan kenenin hemolenfine göç ederler (18). *Babesia bigemina*, kene bağırsağındaki gelişiminin bazı safhalarında, haploid sayıda zigot oluşturmak için tek basamaklı bir mayoz geçirir (14, 19). Kene bağırsak hücrelerinde, poliploid kinetlerin şekillenmesiyle şizogoni oluşur (14). Bu çomak şekilli hareketli kinetler kenenin hemolenfine geçerek ovaryumlar dahil olmak üzere değişik tipte hücre ve dokuları enfekte ederler ki, buralarda sekonder şizogoninin tekrarlayan siklusları gerçekleşir. Böylece, enfekte kenenin yumurtalarıyla larval döneme transovarial nakil gerçekleşir. Bu nakil, tek konutluluk özelliğine sahip *Boophilus* gibi vektörler için olduğu kadar, *Babesia* için de önemli bir hayat siklusu adaptasyonudur.

Transovaryal yolla enfekte doğan larvalarda kinetler, tükürük bezi salgı hücrelerine girerler ve çok çekirdekli dönemlere transforme olurlar. Sporogoni yolu ile önce sporoblastlar, sonra sporoblastların parçalanmasıyla küçük, haploid sayıda sporozoitler meydana gelir (14).

Bütün *Babesia* türlerinde sporozoit gelişimi, her zaman enfekte kene kan emmek için omurgalı konağına tutunduğunda başlar. *Babesia bigemina*'da, sporozoitlerin gelişimi enfekte larvanın konağından kan emmesiyle başlar. Ancak enfektif sporozoitlerin ortaya çıkması yaklaşık 9 günü alır. Dolayısıyla enfektif sporozitler, sadece kenenin nimf ve ergin dönemlerinde ortaya çıkabilirler (20, 21). Nakil, larva döneminin dışında kalan nimf dönemi ve ergin (erkek ve dişi) gelişme dönemlerinde gerçekleşebilir (22-24). Bu durum, *B. bovis*'te farklılık gösterir. *Babesia bovis*'te enfektif sporozoitlerin oluşumu, enfekte doğan larvanın konağından kan emmeye başlamasını takiben 2-3 günde gerçekleşir (25).

2.4. SIĞIRLARDAKİ *BABESIA* TÜRLERİ

Siğirlarda babesiosis'e; *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens*, *B. major* türleri sebep olmaktadır. Bu türlere ilaveten *B. jakimovi*, *B. occultans* ve *B. ovate* türlerinin de siğirlarda görülebildiği bildirilmiştir (4).

2.4.1. *Babesia bigemina* (Smith ve Kilborne, 1893)

Büyük *Babesia* türlerinden olup eritrositler içerisinde armut, yuvarlak, oval veya düzensiz şekilli olup genellikle çift armut formundadır. Yuvarlak formları 2-3µ çapta, uzamış formları ise 4-5µ uzunluğundadır. Eritrositer formlarda konoid, mikroporlar ve tipik mitokondri yoktur. Buna karşın, anterior ve posterior polar halka ve tipik iki adet roptri bulunur (13, 25, 26).

2.4.1.1. Yayılış ve Epidemiyoloji

Babesia bigemina tropik ve subtropik iklim kuşağında birçok ülkede görülmektedir. Özellikle, Afrika, Avustralya, Avrupa, Orta Doğu, Orta ve Güney Amerika'da yaygın olarak görülür; Amerika Birleşik Devletleri'nde ise eradike edilmiştir.

Türkiye'de ilk olarak 1890'da Nicole ve Adilbey tarafından mikroskopik tarifi yapılan *B. bigemina*'nın yol açtığı siğir babesiosis'i çalışmaları; İbrahim Ekrem (27), Lestoquard (28), Gören ve Yetkin (29), Aysoy (30), Mimioğlu (31), Kurtpınar (32)'in araştırmaları ile devam etmiştir. Mimioğlu (31) Karadeniz Bölgesi'nde mikroskopik bakısını yaptığı 70 siğirin 5'inde, Göksu (33) Ankara civarında 996 siğirin 6'sında ve takiben Özcan (34) Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerine getirilen 194 siğirin 2'sinde *B. bigemina*'yı pozitif bulmuşlardır. Diğer yandan Erkut (35) Ege Bölgesi'nde incelediği 141 siğirin 7'sinde piroplasmosis görüldüğünü; Göksu (36) Karadeniz Bölgesi'nin bazı illerinde 37'si babesiosisden şüpheli, 43'ü sağlıklı toplam 80 siğirin 3'ünde, yine aynı araştırmacının Doğu Anadolu siğirleri (37) ile Türkiye'nin farklı bölgelerinde siğirlarda Piroplasma enfeksiyonları üzerine yaptığı araştırmasında (38) Ege ve Marmara Bölgelerinde *B. bigemina*'nın bulunduğu rapor edilmiştir. Takiben Hoffman ve ark. (39) Türkiye'nin Asya bölümünde siğirlarda piroplasmosis vakalarının yaygın olduğunu ve muayenesi yapılan siğirlerin %3,5'inde hastalığın *B. bigemina*'dan kaynaklandığını; Mimioğlu ve ark. (40) Türkiye'de *B. bigemina*'nın diğer *Babesia* türlerine göre daha yaygın olduğunu ileri sürmüştür.

Türkiye’de sığır ve koyunlarda görülen anaplosmosis, piroplasmosis ve theileriosis olguları uluslararası epizootiyoloji bülteninde yer aldıktan sonra mikroskopik olarak *B. bigemina*; İstanbul ve çevresinde piroplasmozis semptomu gösteren 112 sığırın 13’ünde (41), Elazığ yöresinde 69 piroplasmosis şüpheli sığırın 4’ünde (42), Ankara’nın Beytepe köyünde 185 sığırın 3’ünde (43) görülmüştür. Öte yandan *B. bigemina*’nın Van Bölgesi sığırlarında bulunduğu (44), Karadeniz Bölgesi’nde 76 sığırın 72’sinde *Babesia* sp. saptandığı rapor edilmiştir (45). Aynı dönemde Ankara’nın Çubuk ilçesinde *B. bigemina*’nın mikroskopik insidensi %18,8 olarak bulunmuştur (46). Diğer yandan *B. bigemina*’nın mikroskopik prevalansı, Malatya ve bazı Güneydoğu Anadolu illerinde %0,5-1 arasında (47), Samsun yöresi sığırlarında %32,21 (48); Kayseri yöresinde %6,8 (49) olarak rapor edilmiştir. Takiben *Babesia* spp. prevalansı, Konya yöresinde %11,46 (50), Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde %0,6-1,4 arasında (51), Adana yöresinde ise %31,8 (52) oranında bildirilmiştir. Diğer yandan Konya’da Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerine getirilen 11 günlük bir buzağıda *B. bigemina*’dan ileri gelen akut babesiosis olgusu tespit edilmiştir (53).

Türkiye’de sığırlarda babesiosis’in serolojik teşhisi, IFAT ile seroinsidens şeklinde ilk kez Ankara’da yapılmış ve 185 sığırın 9’unda *B. bigemina*’ya karşı antikor saptanmıştır (54). Takiben bir kısım araştırmacı (43, 45, 46, 49-51, 55-61) IFAT ile *B. bigemina*’ya karşı antikor araştırmıştır.

Sığırlarda babesiosis’in seroinsidensi üzerine yapılan çalışmalarda *B. bigemina*; Karadeniz Bölgesi’nde 76 sığırın 47’sinde (%61,84) (45), Ankara’nın Çubuk ilçesinde ise %100 bulunmuştur (46). Takiben *B. bigemina* seropozitifliği; Ankara civarında %49 (56), %80 (57), %7,3 (60) ve %8,8 (59); Adana yöresinde %55 (62) ve %75 (58); Elazığ’da %31,9, Malatya’da %7,1 ve Tunceli’de %7,3 (51); Konya yöresinde %53,07 (50); Kayseri yöresinde %23,03 (49) ve Antakya yöresinde %0,9 (61) olarak bildirilmiştir. Türkiye genelinde *B. bigemina* seropozitifliği, Karadeniz Bölgesi’nde %61,8, Doğu Anadolu Bölgesi’nde %42,9, Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde %48,8, Akdeniz Bölgesi’nde %50,8, Marmara Bölgesi’nde %48,9 ve Ege Bölgesi’nde %68,5 olarak rapor edilmiştir (57). Öte yandan Türkiye’de sığır babesiosis’inin mevsimsel seroinsidensi ve hastalık insidensi, ilk kez Çukurova bölgesinde araştırılmış ve yapılan

seroepidemiyolojik yoklamayla mevsimsel seroinsidens *B. bigemina* için 0,600, hastalık insidensi ise 0,030 olarak saptanmıştır (58).

Son yıllarda moleküler biyolojideki gelişmelere paralel olarak, hastalık etkenlerinin DNA'sını ortaya koymaya yönelik moleküler yöntemler (PCR, RLB vb.) ortaya çıkmış ve kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde bu yöntemler, hastalık etkenlerinin teşhisinde tercih edilir olmuşlardır. Bu gelişmelere paralel olarak, revers line blotting (RLB) tekniği geliştirilmiş ve ilk defa aynı kenede bulunabilen 4 *Borrelia* türünün ayrılması için kullanılmıştır (63). Bu test PCR ürünlerinin bir membranda ayrı sıralara bağlanmış özgün problara hibridizasyonu esasına dayanmaktadır. Teknik, birçok etkenin aynı anda birçok prob ile karşılaştırılmasına olanak sağladığından, oldukça pratik ve kullanışlıdır. Nitekim Gubbels ve ark. (64) bu tekniği sığırlardaki, Schnittger ve ark. (65) ise koyun ve keçilerdeki *Theileria* ve *Babesia* türlerinin eş zamanlı teşhisinde kullanmışlardır.

Türkiye'de PCR ile sığırlarda babesiosis'in teşhisi ilk defa Tanyüksel ve ark. (66) tarafından yapılmış olup *B. bigemina* Ankara yöresinde %8,45, Burdur yöresinde %8 ve Kayseri yöresinde %5 olarak bulunmuştur. Bunu takiben Türkiye'de ilk defa RLB ile yapılan çalışmada, Ankara yöresinde *B. bigemina* pozitifliği %6 olarak saptanmıştır (60). Kayseri yöresinde sığırlarda *B. bigemina*'nın moleküler prevalansı %0,6 (67) ve yine Kayseri'de sığır barınaklarından toplanan kenelerde Türkiye'de ilk defa RLB ile *B. bigemina*'nın moleküler prevalansı %14 olarak tespit edilmiştir (68). Diğer yandan Türkiye'nin çeşitli yörelerinden elde edilen *B. bigemina* izolatlarının moleküler karakterizasyonu yapılmıştır (69, 70). Ayrıca Kayseri yöresinde sığırlardan toplanan keneler üzerinde yapılan moleküler çalışmalar sonucu *Babesia* sp. saptanmış ve bu suş *Babesia* sp. (Kayseri 1) olarak Genbanka kayıt ettirilmiştir (68). Doğu Karadeniz Bölgesi'nde sığırlar üzerinde yapılan moleküler çalışmada *B. bigemina* %0,77 oranında tespit edilmiştir (71).

2.4.1.2. Gelişme

Bu etkenin vektörlüğünü, *Boophilus (Rhipicephalus) annulatus*, *B. microplus*, *B. australis*, *B. calcaratus*, *B. decoloratus*, *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *R. evertsi*, *R. bursa* keneleri yapmaktadır (13, 26, 72). Türkiye'de *B. annulatus*, *Hae. punctata* ve *R. bursa* türleri bulunmaktadır. Bu türün gelişim safhaları,

genel kısımda anlatıldığı gibidir. İntrauterin bulaşma görülebilir ancak bu, hastalığın epidemiyolojisinde önemli olacak seviyede değildir.

2.4.1.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler

Babesiosis'de klinik belirtiler etkenin vektör kene tarafından konaklara verilmesini takiben 9-12 gün içerisinde ortaya çıkar. Hasta hayvanlarda klinik belirtiler farklılık gösterebilmektedir. Bunun sebebi olarak da farklı coğrafik bölgelerdeki *B. bigemina* izolatlarının patojenitelerindeki farklılıklar gösterilebilir. Yapılan bir çalışmada; Avustralya'daki sığırlarda tespit edilen *B. bigemina* suşunun hayvanlarda nadiren enfeksiyona sebep olduğu, buna karşın Afrika'da tespit edilen suşun ise çok daha patojenik olduğu rapor edilmiştir (73). Babesiosis'li hayvanlardaki ilk klinik semptom eritrositlerdeki yıkımlara bağlı olarak ortaya çıkan ve 41,5-42 °C'ye ulaşan yüksek ateştir. Hayvanlarda anoreksi ve ruminal atoni görülür. Tedirginlik, gölgelik alanlara sığınmaya çalışma ve sürekli yerde yatma isteği hasta hayvanlarda gözle görülebilen ilk şüphe uyandırıcı gözlemlerdir. Hayvanlar bulundukları yerde kendi etraflarında kavis çizerler, tüyleri karışmış ve kabarmış olup nefes alışverişlerinde güçlük ve taşikardi görülür. Başlangıçta müköz membranlar kırmızıdır fakat eritrositik yıkımı takiben anemiye bağlı müköz membranlarda soluklaşma oluşur. Anemi çok hızlı bir şekilde meydana gelir ve yaklaşık olarak eritrositlerin %75'i birkaç gün içerisinde yıkımlanır. Buna bağlı olarak da hemoglobinüri ve hemoglobinemi şekillenir. Hemoglobinüri, çoğunlukla olmasına karşın bazı olgularda görülmeyebilir. Hasta hayvanlarda kilo kaybı ve süt veriminde azalmalar görülür. Hemoglobinüriyi takiben ikterus ortaya çıkar. Kan suludur. Akut olgularda, 4-8 gün içinde ölüm görülür. Tedavi edilmeyen hayvanlarda mortalite, %50-90 arasında değişir. Kronik durumlarda ise ateş çok yüksek değildir ve genellikle hemoglobinüri görülmez (27, 72, 74-76).

Akut babesiosis'de konağın plazma bileşiminde değişimler olur. Kinin ve aktif kallikrein düzeyi artar, kininojen seviyesi azalır. Bunlara bağlı olarak damarlarda dilatasyon, kan akışında yavaşlama, kılcal damar duvarlarında bozulmalar olur ve damar duvarlarının geçirgenliği artar. Konglutinin ve fibronektin düzeylerinin azalması sonucu eritrositlerde kümelenme ve kapiller damarlarda tıkanmalar şekillenir. Fibrinojen ile ilgili ürünler artar, plazminojen azalır ve buna bağlı olarak koagülasyon bozuklukları ve eritrosit birikimi görülür. Bu tip patogenez, daha çok parazitli eritrositlerin kümelenerek damarları tıkadığı *B. bovis*'de görülür (26, 75). Bu kapiller

blokajın olmadığı *B. bigemina* ve *B. divergens* enfeksiyonlarında ise en önemli patolojik etki, eritrosit hasarıdır (77). Kinin ve benzeri maddelerin eritrosit yüzeyinin ozmotik geçirgenliğini bozmasıyla eritrositler kolayca lize olur (19). Bunun yanında şiddetli patogenezis; kısmen immunité, özellikle genç danaların dirençli olmasında etkili olan ve birçok hücre içi patojene karşı koruyucu immunitéde rol oynayan interferon gama (IFN- γ), tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve nitrik oksit (NO)'i içeren mediatörlerle ilgilidir (78).

Patogenezisin temeli, eritrositlerdeki devamlı ve şiddetli parazitemi sonucu meydana gelen anemi ve anemik anoksidir. Anemi rejeneratif tipte olup, kan tablosuna bakıldığında retikülositler ve çekirdekli eritrositler görülür. Meydana gelen vazodilatasyon ve azalan kan dolaşımı sebebiyle, non-spesifik genel bir yangı tablosu oluşur (75, 77, 79). Azalan kan dolaşım hızı sebebiyle, bazı hayati organlarda anoksi meydana gelir ve parazitin toksik ürünleri ya da organlardan kaynaklanan metabolik ürünlerle genel bir organ tahribatı oluşur. Retiküloendotelyal sistem hücrelerinin özellikle de histiyositlerin; ölü, anormal eritrositleri ve çözünmüş fibrini uzaklaştırması yanında enfekte eritrositleri uzaklaştırmada da rolü vardır. Histiyositler, dalak ve lenf nodüllerinin sinüsleri ile karaciğerin sinüzoidlerini doldurarak bu organlarda hipertrofi ve hiperplazilere yol açarlar. Dalak ve lenf yumruları, ödem ve hemoglobineye bağlı olarak büyümüş ve siyah renklidir. Hemolitik olaylara oldukça duyarlı olan böbreklerde, glomeruluslar ve renal tubuller hemoglobin ile doludur. Normal şartlarda renal tubullerden geri emilebilen hemoglobin, miktarın fazla olduğu durumlarda emilemeyerek idrara geçer. Böbrekteki hasar, hemolizin şiddetine bağlıdır. Akut olaylarda, böbrek büyümüş ve siyah renklidir. İdrar kesesi, kırmızı renkli idrarla doludur. Koagülasyon mekanizmasında meydana gelen bozukluklar da hastalığın patogenezinde önemlidir (19, 77).

2.4.2. *Babesia bovis* (Babes 1888, Starcovici, 1893)

Küçük *Babesia* türlerindendir. Eritrositler içerisindeki merozoitler; armut, yuvarlak veya düzensiz şekillidirler. Vakuollü taşlı yüzük formları bu tür de yaygın olarak görülür. *Babesia bovis* merozoitleri, 1,5-2,4 μm büyüklüğünde olup genellikle eritrositlerin ortasına yerleşirler (13, 25, 26).

2.4.2.1.Yayılış ve Epidemiyoloji

Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada dışında tüm dünyada görülen bu tür, Güney Avrupa, Orta Doğu ve Rusya’da yaygın olarak görülmektedir. Güney Amerika’da *B. bigemina*’dan daha büyük önem taşımaktadır.

Türkiye’de *B. bovis*, ilk kez Mimioğlu (31) tarafından Samsun, Ordu, Giresun ve Bolu vilayetlerinde sığırlarda “*Haemataurais vesicalis bovis*” araştırması ile gündeme gelmiş; Göksu (33) Ankara’da incelediği 996 sığırın 2’sinde, takiben aynı araştırmacı (36) bazı Karadeniz illerinde mikroskopik bakısı yapılan 80 sığırın 3’ünde *B. bovis*’i bulmuştur. Göksu (38) Türkiye’nin farklı bölgelerinde sığırlarda Piroplasmida enfeksiyonları üzerine yaptığı araştırmasında *B. bovis*’in Marmara ve Güney Doğu Anadolu’da görüldüğünü; Mimioğlu ve ark. (40) *B. bovis* (*Babesia berbera*) Karadeniz bölgesinde daha fazla bulunduğunu ileri sürmüşlerdir. Öte yandan mikroskopik bakıyla, Elazığ yöresinde iç organlarından froti yapılan 4 sığırın 1’inde (42) ve Ankara’da 185 sığırın 1’inde (56) *B. bovis* saptanmıştır. *Babesia bovis*’in mikroskopik pozitifliği; Marmara bölgesinde %34,8 (41), Malatya ve bazı Güneydoğu Anadolu illerinde %0,5-1,5 arasında (47); Samsun yöresinde %29,53 (48), Kayseri yöresinde %1,04 (49) bulunmuş ve mikroskopik insidensi Ankara’nın Çubuk ilçesinde %9 olarak saptanmıştır (80).

Babesia bovis seroinsidensi; IFAT ile Ankara’nın Beytepe köyünde 185 sığırın 18’inde (43, 54), Ankara yöresinde 46 sığırın 22’sinde (55), Karadeniz bölgesinde 76 sığırın 34’ünde (%44,73) (45), Ankara’nın Çubuk ilçesinde %59 (80) bulunmuştur. Çukurova bölgesinde sığır babesiosis’inin mevsimsel seroinsidensi *B. bovis* için 0,292 ve hastalık insidensi ise 0,030 olarak saptanmıştır (58). *Babesia bovis* seropozitifliği; Türkiye genelinde ELISA ile %51,2 (81); IFAT ile Ankara civarında %10,4 (56), %41,6 (57), %1,3 (60) ve %2,4 (59); Elazığ’da %1,4 ve Tunceli’de %0,6 (51); Kayseri yöresinde %1,04 (49); Doğu Anadolu’da %5,6, Güneydoğu Anadolu’da %6,4, Akdeniz’de %31,6, Ege’de %51,4 ve Marmara’da %41,8 (57) olarak saptanmıştır.

Diğer yandan Türkiye’de *B. bovis*’in moleküler prevalansı; PCR ile Ankara yöresinde %12,68, Burdur yöresinde %8 ve Samsun yöresinde %3,85 (66); RLB ile Ankara yöresinde %2,3 (60), Trakya bölgesinde %1,3 (82) olarak saptanmıştır. Diğer yandan Türkiye’nin çeşitli yörelerinden elde edilen *B. bovis* izolatlarının moleküler karakterizasyonu yapılmıştır (69, 70, 83, 84). Karadeniz bölgesinde *B. bovis*’in

moleküler prevalansı; RLB testi ile %1,8, *B. bigemina* prevalansı %2,2 olarak bildirilmiştir (83). Ege bölgesinde ise *B. bovis* prevalansı %1,02 olarak tespit edilmiştir (83, 84) .

2.4.2.2. Gelişme

Bu etkenin vektörlüğünü, *Boophilus calcaratus*, *B. microplus*, *B. australis*, *Rhipicephalus bursa* ve *Ixodes persulcatus* keneleri yapmaktadır (13, 25, 26). Türkiye’de *R. bursa* türü bulunmaktadır. Gelişim safhaları genel kısımda anlatıldığı gibidir.

2.4.2.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler

Babesia bigemina ile benzerdir. İnkübasyon periyodu 2-10 gündür. Yüksek ateş 2-3 gün sürer. *Babesia bigemina*’ya göre daha patojen bir türdür. Anemi, ikterus ve ishal görülür. *Babesia bigemina*’dan farklı olarak hemoglobini ve hemoglobini oluşabilir fakat her zaman görülmeyebilir. Koagülasyon mekanizmasındaki bozukluklara bağlı klinik belirtiler, *B. bigemina*’dan daha şiddetlidir. Özellikle kapiller damarlarda görülen stazis ve tıkanmalar daha yaygındır. Bu lezyonlar, özellikle beyin kapillerlerinde yaygın olarak görülür. Hastalığın akut formunda, hipertansif şok tablosu görülür. Ölüm *B. bigemina*’ya göre daha yaygındır. *Babesia bigemina* ile enfekte hayvanlarda ölüm genellikle hemotokrit değeri %10’nun altına düştüğünde görülürken, *B. bovis* ile enfekte hayvanlarda bu oran %12 veya daha yüksek iken ölümler görülür (23, 73).

2.4.2.4. Zoonotik Önemi

Splenektomili insanlarda, bu türe bağlı babesiosis vakaları rapor edilmiştir (26, 85).

2.4.3. *Babesia divergens* (M’Fadyean and Stockman, 1911)

Küçük *Babesia* türlerindendir (0,4-1,5µm). Merozoitleri, genelde çift halde bulunurlar, aralarındaki açığı geniştir ve genellikle eritrositlerin periferine yerleşirler. Ayrıca tombul, armut şeklinde ve yuvarlak formlar da görülebilir. Merozoitlerde, konoid, mikroporlar, tipik golgi aygıtı ve mitokondri yoktur. Mitokondri benzeri veziküller ve 3 veya daha fazla roptri vardır (13, 25, 26).

2.4.3.1. Yayılış ve Epidemiyoloji

Avrupa ve Rusya'da sık görülür. Özellikle Avrupa'nın Kuzey'inde daha yaygındır. Ancak Tunus gibi Akdeniz ülkelerinde de bildirilmiştir.

Türkiye'de *B. divergens* bugüne kadar mikroskopik olarak bildirilmemiştir. Bu türle ilgili serolojik çalışmalar da sınırlıdır. Ankara yöresinde (55) ve Ankara'nın Beytepe köyünde (43, 54) IFAT ile yapılan seroinsidens çalışmalarında ve Antakya yöresinde (61) IFAT ile yapılan seroprevalans yoklamasında *B. divergens*'e karşı antikor saptanamamıştır. Buna karşılık IFAT ile Karadeniz Bölgesi'nde yapılan seroinsidens çalışmasında 76 sığırın 57'sinde *B. divergens*'e karşı antikor olduğu saptanmıştır (45). Diğer yandan *B. divergens* seropozitifliği; Doğu Anadolu'da %3,7, Akdeniz'de %7,2, Ege'de %18,5, Marmara'da %2 ve Karadeniz'de %75 (57); Elazığ'da %3,5, Malatya'da %0,6 ve Tunceli'de %1,2 (51) ve Kayseri yöresinde %2,09 (49) olarak bildirmiştir. Çukurova'da sığır babesiosis'inin mevsimsel seroinsidensi *B. divergens* için 0,121; hastalık insidensi ise 0,030 olarak saptanmıştır (58).

Türkiye'de *B. divergens*'in moleküler prevalansı; PCR ile Samsun yöresinde %3,37 (66); Ankara yöresinde RLB ile %1,1 olarak saptanmıştır (59).

2.4.3.2. Gelişme

Bu etkenin vektörlüğünü, *Ixodes ricinus* yapmaktadır (13, 25, 26). Türkiye'de *I. ricinus* türü bulunmaktadır. Gelişim safhaları genel kısımda anlatıldığı gibidir.

2.4.3.3. Zoonotik Önemi

İnsanlarda özellikle de splenektomili kişilerde hastalığa sebep olmaktadır (77, 86, 87).

2.4.4. *Babesia major* (Sergent, Donatien, Parroti Lestoquard and Plantureux, 1926)

Büyük *Babesia* türlerindendir. Merozoitler, eritrositlerin merkezinde yer alır. Çift armut şeklindeki formlar 1,5x2,6 µm, yuvarlak formlar ise 1,8 µm çapında olup aralarındaki açı dardır (13, 25, 26, 72).

2.4.4.1. Yayılış ve Epidemiyoloji

Avrupa'da, Kuzey Afrika'da ve Rusya'da görülmektedir.

Babesia major'un Türkiye'nin Marmara bölgesinde varlığı iddia edilmiş (88) fakat bugüne kadar mikroskopik ve serolojik olarak pozitiflik bildirilmemiştir. Ayrıca, son

yıllarda RLB ile yapılan araştırmalarda *B. major*'ün moleküler pozitifliği Ankara yöresinde %0,2 olarak saptanmıştır (59).

2.4.4.2. Gelişme

Bu etkenin vektörlüğünü, *Boophilus calcaratus*, *Haemaphysalis punctata* keneleri yapmaktadır (13, 25, 26). Türkiye'de *Hae. punctata* bulunmaktadır. Gelişim safhaları genel kısımda anlatıldığı gibidir.

2.4.4.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler

Patojenitesi düşük olup, klinik belirtiler *B. bigemina*'ya benzer.

2.4.5. *Babesia jakimovi*

Bu tür büyük *Babesia* etkenlerinden olup özellikle Sibiry'a'da sığırlarda görülmekte, bunun yanında karacalarda ve ren geyiklerinde de hastalığa sebep olmaktadır. Transovaryal olarak *Ixodes ricinus* kenisi tarafından nakledilmektedir. Ayrıca mekanik olarak at sinekleri tarafından da nakledildiği bildirilmiştir. Klinik belirtiler *Babesia bigemina*'ya benzemektedir (8).

2.4.6. *Babesia occultans*

Bu tür özellikle Güney Afrika'daki sığırlarda görülmekte olup *B. bigemina*'dan biraz küçük bir türdür. *Hyalomma marginatum rufipes* vektörlüğünü yapmaktadır (2, 19).

2.4.7. *Babesia ovate*

Bu tür de büyük *Babesia* etkenlerinden olup özellikle Japonya'daki sığırlarda tespit edilmiştir. *Babesia bigemina*'ya benzemektedir. Vektörlüğünü *Haemaphysalis longicornis* yapmaktadır (89).

2.5. BABESIOSIS'TE TEŞHİS

Bütün hayvan türlerinde akut babesiosis'te yüksek ateş (40- 41,5°C), anemi, ikterus ve hemoglobunüri gibi klinik belirtiler görülür. Bunun yanında kırıgnlık, depresyon ve zayıflık gibi genel semptomlar da görülebilir. İnsanlarda ise semptomlar, malarya'ya benzemekle beraber aniden ortaya çıkar ve intravasküler hemoliz, hemoglobunüri, sarılık, kaslarda ağrı, titreme, solunum güçlüğü ve sürekli ateşle seyreder (90, 91). Teşhiste; mevsim, kene enfestasyonu, unstabil bölge gibi epidemiyolojik veriler şüpheleri artırabilir. Ancak hastalığın teşhisi perifer kandan yapılmış ve Giemsa ile

boyanmış preparatların mikroskopik incelenmesinde eritrositler içerisinde parazitin görülmesiyle olur. Hastalığa hangi türün yol açtığını belirlemek için ise, parazite karşı oluşan spesifik antikorların serolojik yöntemlerle (IFAT, ELISA vb.) saptanması veya parazit DNA'sının moleküler yöntemlerle (PCR, RLB, Nested-PCR vb.) tespit edilmesi gerekir (77, 92). Bu testler için konusunda uzman kişilere ihtiyaç duyulması, uzun zaman alması, laboratuvar malzemelerine ihtiyaç duyulması ve saha şartlarında uygulanamaması gibi dezavantajlar olduğundan son zamanlarda Japonya'da immunochromatographic test (ICT) adı verilen hızlı ve basit bir strip serodiyagnostik test geliştirilmiştir. Uzman olmayan kişilerin dahi kolaylıkla kullanabileceği bu test nitroselüloz membran tabanlı olup, membran üzerine *B. bovis* (rap-1), *B. bigemina* (rap-1), *T. equi* (EMA-2t) ve *B. caballi* (Bc48)'ye ait rekombinant proteinler emdirilmiş ve bu membran üzerine şüpheli hayvana ait bir damla kan (antikor) damlatılarak kolaylıkla teşhis yapılabilmektedir (93).

2.5.1. Mikroskopik Muayene

Bu yöntem, tekniğine uygun olarak hasta hayvanlardan alınmış kan örneklerinden ince yayma veya kalın yayma preparatlar hazırlanması suretiyle ince yayma frotiler metil alkolde 5 dakika, kalın yayma frotiler ise 100 °C'de 15 dakika tutularak tespit edildikten sonra Giemsa ile boyanarak mikroskop altında incelenmesi ve etkenlerin görülmesiyle yapılmaktadır. Yöntem kolaylıkla uygulanabilmekte olup deneyimli personel gerektirmektedir (26, 76, 94, 95). Mikroskopik muayene için alınan kanın vena jugularis yerine, kapillar damarların geçtiği kuyruk ucu veya kulak ucundan alınması tercih edilmelidir. Çünkü *Babesia* etkenlerini içeren eritrositler kapillar damarlarda birikme eğilimindedirler. Ölüm sonrası yapılan muayenelerde de kandan veya dalak, karaciğer, kemik iliği gibi organlardan hazırlanan sürme preparatlarla da teşhis yapılabilmektedir (26, 76, 94, 95).

Mikroskopik muayene, ince yayma froti veya kalın yayma froti yöntemleriyle yapılmaktadır. Paraziteminin çok yoğun olduğu durumlarda etkenlerin morfolojilerinin daha sağlıklı teşhis edilebilmesi amacıyla ince yayma froti yöntemi kullanılmaktadır. Bunun için çok az miktarda kan temiz bir lam üzerine damlatılarak froti hazırlanır. Kalın yayma froti yöntemi ise paraziteminin düşük olduğu durumlarda tercih edilmektedir. Kalın damla kan preparatlarıyla daha fazla hacimde kan incelenir (26, 76,

94, 95). Her iki yöntemle yapılan frotilerde de lam ve lamellerin temiz olmasına, boyama solusyonun dikkatli hazırlanmasına özen gösterilmelidir. Çünkü deneyimli olmayan personel tarafından yapılan incelemelerde toz partikülleri ile etkenler bazen karıştırılabilmektedir. İnceleme esnasında tüm saha dikkatle incelenmelidir. Asgari 200 mikroskop sahasının incelenmesi esasına dayanan bu durum çok sayıda inceleme yapılmasını gerektiren durumlarda oldukça zaman almaktadır. Her iki yöntemle de yapılan mikroskopik incelemelerde etkenlerin görülmesi enfeksiyonun varlığının göstergesidir. Fakat bazı durumlarda (hastalığın çok erken dönemi veya kronik dönem) frotilerde etkenler görülemeyebilir. Etkenin frotilerde görülememesi enfeksiyonun hayvanda kesinlikle olmadığı manasına gelmez (94, 95). Mikroskopik bakıda pozitif bulunan hayvanlarda paraziteminin hesaplanmasında; en az 50 mikroskop sahasındaki enfekte olan ve enfekte olmayan eritrositler sayılır. Bulunan rakamların ortalaması 4 ile çarpılarak 200 mikroskop sahasındaki sayılar bulunur. Parazitemi;

Parazitemi (%)=Enfekte eritrosit sayısı/Enfekte olan+enfekte olmayan eritrosit sayısı x100 formülü ile hesaplanır.

2.5.2. Serolojik Testler

Babesiosis'in tanısında, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test), sELISA (Slide Enzyme Linked Immunosorbent Assay), IHAT (Indirect Hemagglutination Test), CFT (Complement Fixation Test), LAT (Latex Agglutination Test) ve RIA (Radioimmunoassay) gibi serolojik testler kullanılmaktadır (26, 76, 94, 96). Akut babesiosisli hayvanların eritrosit, serum veya dokularından hazırlanan antijenlerin kullanıldığı bu testler subklinik seyirli hayvanların serumlarında antikor aranması tekniğine dayanmaktadır. Bu testlerle parazit antijenlerine karşı antikor aranmasının yanında parazit antikorlarına karşı antijen aranması da mümkündür. Serolojik testler, kronik enfeksiyonların teşhisinde kullanışlı değildir. Çünkü hayvanın kanında etken olmasa bile antikorların varlığı devam etmekte olduğundan serolojik testlerin yanlış pozitiflikler verdiği ve bazı *Babesia* türleri arasında çapraz reaksiyonların şekillenebildiği bildirilmiştir (26, 72, 94, 96).

Babesiosis'in serolojik olarak teşhisinde ilk olarak kullanılan test CFT testidir. Fakat bu testin duyarlılığı düşüktür (97, 98). Bu teste göre duyarlılığı ve güvenilirliği daha fazla olan IFAT tekniği babesiosis'in teşhisinde en sık kullanılan serolojik testlerdendir.

Ancak bu testte *Babesia* türleri kendi aralarında çapraz reaksiyonlar verebilmektedir (99-101). Serolojik yöntemlerden ELISA testi de oldukça duyarlı ve etkili bir testtir. Bu test ile bir seferde çok miktarda örnek incelenebilmektedir. Bununla birlikte, testte antijen kalitesi testin duyarlılığını etkilemektedir. Enfekte eritrositlerden hazırlanan antijenler, konak eritrositleri ile kontamine olduklarından, anti-eritrositik antikorlar sebebiyle yanlış sonuçlara sebep olmaktadır. Bu sorunun önüne geçebilmek için saflaştırılmış rekombinant antijenler kullanılmaktadır (102-104).

2.5.3. Moleküler Teknikler

Son yıllarda, mikroskopik incelemeler ve serolojik yöntemlerden farklı olarak parazite ait DNA veya RNA'nın varlığını ortaya koymaya yarayan PCR (Polymerase Chain Reaction), Multiplex PCR, Nested PCR, Reverse Transcriptase PCR, Real-Time PCR, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) PCR, RLB (Reverse Line Blotting) gibi moleküler testler babesiosisin teşhisinde sıklıkla kullanılmaya başlamıştır (94, 95, 105, 106).

Elbetteki her tanı yönteminin kendi içerisinde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Doğrudan etkeni görmeye yönelik yapılan mikroskopik muayenenin; basit olması, parazitlerin morfolojik olarak ayrımlarının yapılabilmesi, parazitin direkt araştırılması gibi avantajlarının yanında; zaman alması, zahmetli ve yorucu olması, parazit sayısının düşük olduğu durumlarda yanıltıcı olabilmesi, parazitlerin morfolojik olarak ayrımlarında karışıklıkların olabilmesi ve deneyimli personel gereksinimi gibi dezavantajları da mevcuttur (94,95,105). Yine serolojik yöntemlerin de avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Basit ve hızlı olması, otomasyona olanak vermesi, çok sayıda örneğin eş zamanlı olarak teşhis edilebilmesi serolojik testlerin avantajlarından olup; düşük özgüllük, aktif ile atlatılmış veya latent enfeksiyonların ayırt edilememesi, parazitler arasında çapraz reaksiyonların şekillenmesi bu testlerin olumsuz yanlarını yansıtmaktadır (94, 95,105). Bu yöntemlere alternatif olarak geliştirilen nükleik asit tabanlı moleküler teknikler ile immun sistemden bağımsız veya atlatılmış enfeksiyonlardan etkilenmeksizin konak vücudunda çok az miktarda etken olsa dahi direkt hastalığa neden olan türlerin teşhisleri yapılabilmektedir. Bu moleküler yöntemlerle hastalığa neden olan parazit türlerinin eş zamanlı olarak teşhisleri de yapılabilmektedir. Tabi ki her yöntem gibi bu moleküler yöntemlerin de bazı

dezavantajları bulunmaktadır. Bu yöntemler ekonomik olarak pahalı ve çok aşamalı yöntemler olup, inhibitörleri nedeniyle yanlış negatiflikler verebilmekte ve kontaminasyona bağlı yanlış pozitiflikler de gösterebilmektedir (94, 95, 105).

Bu moleküler yöntemlerin hemen hepsinde PCR aşaması mevcuttur. PCR kullanılmaya başlandığından bu yana sürekli geliştirilmekte ve daha duyarlı ve güvenilir sonuçlar için çeşitli varyasyonları ortaya konulmaktadır. Bu yöntem, hedef organizmanın genomundaki, özgül bir DNA dizilimini, tekrarlayan şekillerde, binlerce kez çoğaltarak, kolaylıkla tespit edilebilir hale getirmektedir. PCR'ın modifiye edilmesiyle birlikte; PCR ürününün daha spesifik primerlerle ikinci kez PCR'ını kapsayan Nested PCR (107), birden fazla primer çifti kullanılarak tek reaksiyonda birçok hedef bölgenin aynı anda çoğaltılmasını sağlayan Multiplex PCR (108, 109), kantitatif olarak parazit DNA'sının miktarını tespit eden ve dolayısıyla varlığını ortaya koyan Real-Time PCR (110), bir testte eş zamanlı olarak çok sayıda hastalık etkeninin tespit edilmesine olanak sağlayan RLB (67, 111, 112), parazitin RNA'sının tespitine yönelik yapılan Reverse Transcriptase PCR (113, 114) testi gibi testler geliştirilmiştir. Bu testler babesiosis'in teşhisinde son yıllarda Türkiye'de ve Dünya'da sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Türkiye'de bu yöntemlerle yapılan çalışmalarda genellikle *Babesia* türlerinin 18S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu yapılmış ve bunların sekans dizilimleri ortaya konmuştur (67, 111, 112). Dünya'da da bu gen bölgesi sıklıkla kullanılmakta (64, 105, 115-122), bunun yanında özellikle sığır babesiosis'i üzerine yapılan aşı çalışmalarında VMSA genleri (*msa-1*, *msa-2a₁*, *msa-2a₂*, *msa-2b*, *msa-2c*) ve *rap-1* geninin amplifikasyonu yapılmakta ve bu gen bölgelerini içeren suşların sekans dizilimleri ortaya konmaktadır (123-142).

Real-time PCR, PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Birçok isimlendirilme yapılan bu teknoloji yabancı yayınlarda “kinetik PCR”, “homojen PCR”, “kantitatif Real-time PCR” gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir (143).

Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını, patojenleri ve DNA hasarını belirleme, metilasyon tespiti, SNP (single nucleotide

polymorphisms) analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları mevcuttur (144).

Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında SYBR Green I ve Etidyum Bromid yöntemi, DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesi özel bir bölge ise bu bölgenin saptanmasında floresan işaretli probler kullanılır. Bu tekniklerin başında TaqMan prob, molecular beacon, FRET (fluorescence resonance energy transfer), hibridizasyon prob ve Scorpion primer gibi floresan işaretli probler kullanılarak yapılanlardır (144). Son yıllarda Real Time PCR tekniğinin sığırlarda babesiosis'in araştırılmasında da kullanılmaya başladığı görülmektedir (92, 144, 145).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali (Sığırlar) ve Kan Örnekleri

Bu çalışmanın materyalini, 2007-2009 yıllar arasında Türkiye'nin farklı illerindeki sığırlardan toplanmış ve Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Cryobankında muhafaza edilen 400 adet EDTA'lı (di-sodium ethylenediamine tetra-acetate) kan örneği oluşturmuştur. Araştırmaya dahil edilen örneklerin il ve yıla göre dağılımı Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kan örneklerinin alındığı iller ve örneklerin dağılımı

İller	YIL			
	2007	2008	2009	TOPLAM
Amasya	-	15	2	17
Sakarya	-	1	-	1
Karabük	19	44	-	63
Artvin	-	-	1	1
Ordu	-	7	-	7
Çorum	-	21	-	21
Trabzon	-	24	-	24
Giresun	-	34	1	35
Bartın	-	20	1	21
İstanbul	5	30	-	35
Afyon	-	-	3	3
Bolu	-	17	1	18
Tokat	-	17	-	17
Hatay	-	-	12	12
Erzurum	-	-	13	13
Antalya	-	-	30	30
Adana	-	-	21	21
Kahramanmaraş	-	-	10	10
Zonguldak	-	-	9	9
Burdur	-	-	22	22
Kayseri	10	-	-	10
Kastamonu	1	-	2	3
Samsun	2	1	1	4
Bursa	2	-	-	2
Aydın	-	1	-	1
TOPLAM	39	232	129	400

3.2. LABORATUAR ÇALIŞMALARI

3.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Sığır kanlarından DNA ekstraksiyonu, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan ekstraksiyon ünitesinde yapılmıştır.

Analize tabi tutulana kadar -20°C'de muhafaza edilen EDTA'lı kan örnekleri ekstraksiyon öncesinde oda ısısında çözünmeye bırakılmıştır. Çözünen örneklerden DNA ekstraksiyonu, tam otomatik DNA/RNA ekstraksiyon cihazında (Bioneer Exiprep™ 16) yapılmıştır. Final elüsyon 50µl olacak şekilde ayarlanmış ve elde edilen DNA miktarları Nanodrop spektrofotometre (ACT Gene ASP-3700) kullanılarak ölçülmüştür. Genomik DNA ekstraktları kullanılabilecek kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR) ve Jel Elektroforez

Reverse Line Blotting testinin yapılabilmesi için gerekli ampikonların elde edilmesi amacıyla PCR işlemi yapılmıştır. PCR reaksiyonunda primer olarak *Theileria* ve *Babesia* soylarındaki parazitlerin 18S rRNA (ribosomal RNA) geninin değişken V4 bölgesinden, büyüklüğü yaklaşık 390 ile 430 bp (base pairs= baz çifti) arasında değişen bir bölgeyi amplifiye eden genel primerler (Tablo 3.2) kullanılmıştır (115).

Tablo 3.2. RLB testi amacıyla yapılan PCR'da kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Dizilimi (5'---3')	TM* (°C)
RLB-F2	GACACAGGGAGGTAGTGACAAG	56,9
RLB-R2	biotin-CTAAGAATTTACCTCTGACAGT	52,2

*TM: Melting Temperature

PCR testinin çalışıp çalışmadığının ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla; pozitif kontrol olarak laboratuvarımızda mevcut olan *Babesia* ve *Theileria* izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır.

PCR reaksiyonu için karışım hazırlanırken Georges ve ark. (115) ve Gubbels ve ark. (64) tarafından bildirilen protokol modifiye edilmiş ve uygun bir optimizasyon sağlanmıştır (Tablo 3.3).

Tablo 3. 3. PCR reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları

Malzemeler	Miktarları (µl)
10XTaq buffer (with (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1,25 ml)	5
MgCl ₂ (25 mM)	4
dNTP Mix (10 mM each)	1
RLB-F2 primeri (100 pmol/ µl)	0,7
RLB-R2 primeri (100 pmol/ µl)	0,7
Taq DNA Polymerase (recombinant, 5 u/ µl, 500 u)	1
Deiyonize su	32,6
Genomik DNA	5
TOPLAM HACİM	50

Laminar kabin içerisinde steril şartlarda hazırlanan PCR reaksiyon karışımı 0,5 ml'lik DNA'se ve RNA'se free ependorf tüpleri içerisine konulmuştur. Tüpler thermal cycler cihazına (Thermo Hybaid) yerleştirilerek amplifikasyona tabi tutulmuştur. Amplifikasyon için gerekli PCR şartları Tablo 3. 4'de verilmiştir.

Tablo 3. 4. PCR amplifikasyonu için thermal profil

Siklus Sayısı	Isı	Süre
1 siklus	94 °C	3 dakika
2 siklus	94 °C 67 °C 72 °C	20 saniye 30 saniye 30 saniye
2 siklus	94 °C 65 °C 72 °C	20 saniye 30 saniye 30 saniye
2 siklus	94 °C 63 °C 72 °C	20 saniye 30 saniye 30 saniye
2 siklus	94 °C 61 °C 72 °C	20 saniye 30 saniye 30 saniye
2 siklus	94 °C 59 °C 72 °C	20 saniye 30 saniye 30 saniye
40 siklus	94 °C 57 °C 72 °C	20 saniye 30 saniye 30 saniye
1 siklus	72 °C	10 dakika

PCR ile amplifikasyon sonucu elde edilen ampliconların görüntülenmesi amacıyla %1,5'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Elden edilen PCR ürünlerinin her birinden 10 µl alınıp 90 V'da 50 dk, jel elektroforeze tabii tutulmuştur. Sonuçlar jel dökümantasyon sistemi (Gen Genuis) ile UV ışın altında görüntülenmiştir. PCR ürünlerinden arta kalan 40 µl'lik ampliconlar ise RLB hibridizasyonunda kullanılmak amacıyla +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Reverse Line Blotting (RLB)

RLB'de kullanılacak prob lar, negatif yüklü olan Biodyne C membrana (Pall Biosupport group, Ann Arbor, MI) kovalent olarak bağlanabilmeleri için, 5' - uçlarında amino grubu (N-terminal N-trifluoracetamidohexyl-cyanoethyl, N, N-diisopropyl phosphoramitide (TFA)-C₆ aminolinker) içerecek şekilde Genset (Fransa), Isogen (Hollanda) ve MWG (Almanya) firmalarına sentezlettirilmiştir. Probların sekans dizilimleri Tablo 3.5'de verilmiştir (64, 65, 115).

Tablo 3.5. RLB Problarının Sekans Dizilimleri

Hedef türler	Konsantrasyon (pmol)	Prob dizilimi (5'---3')
Piroplasm Türleri (Catch All)	100	TAATGGTTAATAGGARCRGTTG
<i>Babesia</i> sp.	100	CCT(GT)GGTAATGGTTAATAGGAA
<i>Babesia bovis</i>	100	CAGGTTTCGCCTGTATAATTGAG
<i>Babesia bigemina</i>	100	CGTTTTTTCCCTTTTGTGG
<i>Babesia divergens</i>	400	GTTAATATTGACTAATGTCGAG
<i>Babesia major</i>	200	TCCGACTTTGGTTGGTGT

T: Thymine; A: Adenine; C: Cytosine; G: Guanine; R: A veya G; W: A veya T

RLB için membran hazırlandıktan sonra hibridizasyon aşağıdaki gibi yapılmıştır (115).

1. PCR sonucu elde edilen PCR ürünlerinden 40 µl alınarak üzeri 2X SSPE/0.1 SDS karışımı ile 150 µl'ye tamamlandı.
2. Sulandırılan örnekler 100 °C'de 10 dakika süre ile denatüre edildi ve denatüre edilen ürünler tekrar yapışmaya maruz kalmamaları için aniden buz üzerinde soğutuldu.

3. Membran oda ısısında 2X SSPE/0.1 SDS ile sallanan bir platformda 5 dakika inkübe edildi.
4. Membran önceden yüklenen oligonükleotid sıraları ile miniblotterın kanalları 90° açı yapacak şekilde miniblottera yerleştirildi.
5. Membranda kalan fazla sıvı uzaklaştırıldı.
6. Hava kabarcığı olmayacak şekilde, sulandırılmış PCR ürünleri slotlara dolduruldu. Düz bir zeminde 42 °C'de 1 saat hibridize edildi. Bu esnada slotlar arasında geçiş olmamasına dikkat edildi ve platformun sallanmamasına özen gösterildi.
7. İnkübasyon sonunda aspirasyon ile örnekler membrandan uzaklaştırıldı. Membran pens yardımıyla alındı.
8. Miniblotterdan alınan membran, 52°C'de 2X SSPE/0.5 SDS solusyonu ile 2 defa 10 dakika yıkandı.
9. Daha sonra membran 42 °C'de 30 dakika 5 ml peroksidaz ile işaretlenmiş streptavidin konjugatı ile hafif çalkalanarak (2X SSPE/%0.5 SDS ile 1:4000 oranında sulandırıldı) inkübe edildi.
10. Membran, 42°C'de 2X SSPE/0.5 SDS solusyonu ile 2 defa 10 dakika yıkandı.
11. Bu yıkama işlemini takiben membran oda ısısında 2X SSPE ile 2 defa 4 dakika yıkandı.
12. Membran daha sonra 4 ml ECL sıvısı ile 1 dakika inkübe edildi.
13. İnkübasyondan sonra membranın üzeri asetat ile örtülerek hava kabarcıkları uzaklaştırıldı.
14. Görüntüleme amacıyla karanlık odada asetatın üzerine ECL filmi koyuldu ve sinyal yoğunluğuna göre 1 dakika ile 10 dakika arasında film asetatın üzerinde tutuldu.
15. ECL film daha sonra banyo edildi.

Değerlendirmede filmler üzerinde prob ve PCR ürünlerinin döküldüğü sıralarının kesiştiği yerlerde meydana gelen siyah lekeler pozitif olarak kabul edildi.

3.2.4. Nested-PCR

Sığır kanlarından elde edilen DNA ekstraktları ilk PCR reaksiyonunda *Babesia bovis* ve *B. bigemina*'nın 18S rRNA gen bölgesinden yaklaşık 582bp bölgeyi amplifiye eden KB-16 ve KB-17 primerleri ile analize tabii tutulmuştur. Reaksiyon karışımı 2,5 µl 10XPCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 1µl 20 pmol her bir primer, 2 µl 200 mM her bir dNTP, 1.25U Taq DNA polymerase ve 1 µl template DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra karışım thermalcyclere yerleştirilmiş ve initial denaturation: 95°C'de 2 dk; 40 siklus, denaturation: 94°C'de 1dk, annealing: 58°C'de 1dk (gradient PCR uygulanarak modifiye edilmiştir), extension: 72°C'de 1dk; final extension: 72°C'de 7 dk olacak şekilde programlanmıştır.

Tablo 3.6. Nested-PCR'da Kullanılan Primerler

	Primer		Dizilimi (5'---3')
<i>B. bigemina</i>	1. PCR	KB-16	CATCAGCTTGACGGTAGGG
		KB-17	GTCCTTGGCAAATGCTTTC
	Nested-PCR	KB-18	GATGTACAACCTCACCAGAGTACC
		KB-19	CAACAAAATAGAACCAAGGTCCTAC
<i>B.bovis</i>	1. PCR	KB-16	CATCAGCTTGACGGTAGGG
		KB-17	GTCCTTGGCAAATGCTTTC
	Nested-PCR	KB-24	GGGGGCGACCTTCAC
		KB-25	CTCAATTATACAGGCGAAAC

İlk PCR'dan sonra elde edilen ampliconlardan 0,5µl alınarak *B. bigemina* için 18S rRNA gen bölgesinden 262 bp'lık bölgeyi amplifiye eden KB-18 ve KB-19 primerleri ile *B. bovis* için ise 18S rRNA gen bölgesinden 217 bp'lık bölgeyi amplifiye eden KB-24 ve KB-25 tür spesifik primerler ile nested PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. PCR protokolleri ilk reaksiyon ile aynı olup *B. bovis* için annealing 53°C'de 30s, *B. bigemina* için 65°C'de 30s (gradient PCR uygulanarak modifiye edilmiştir) olarak uygulanmıştır. Nested-PCR için kullanılan primerler Tablo 3. 6'da verilmiştir (146).

3.2.5. Real Time-PCR

Kan örneklerinde *B. bovis* ve *B. bigemina* türlerinin Real Time PCR ile araştırılmasında sırası ile Sybergreen ve TaqMan prob bazlı QPCR kullanılmıştır. Sybergreen tabanlı QPCR’da FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) Mix (Roche Diagnostics, Germany) kullanılarak *B. bovis*’in Msa2c gen bölgesinden 97-bp bölgeyi amlifiye eden Msa2c 2F, Msa2c 2R primerleri ile örneklerin Real Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir (145). Pozitif kontrol olarak anabilim dalındaki referans *B. bovis* izolatu, negatif kontrol olarak ise steril deiyonize su kullanılmıştır. PCR master mix üreticinin açıklamalarına göre toplam 25 µl hacimde aşağıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

FastStart Universal SYBR Green Master Mix	12,5 µl
Msa2c 2F (10 pmol)	1,0 µl
Msa2c 2R (10 pmol)	1,0 µl
Genomik DNA (50 ngr)	1,0 µl
PCR Grade Deiyonize su	9,5 µl

Real Time PCR analizleri Stratagene Mx 3005P (Stratagene, Agilent Technologies, USA) cihazında gerçekleştirilmiştir. *B. bovis* için kullanılan termal profil aşağıda gösterilmiştir (145).

1. 50°C 2dk } 1 siklus [uracil N-deglycosylase digest]
2. 95 °C 2dk } 1 siklus
3. 95 °C 30s } 40 siklus
4. 60 °C 15s }
5. 95 °C 15s }
6. 60 °C 1dk } 1 siklus [Melting Curve Analizi]
7. 95 °C 15s }

TaqMan prob bazlı QPCR’da Brilliant II QPCR Master Mix (Stratagene, Agilent Technologies, USA) kullanılarak *B. bigemina*’nın RAP-1 gen bölgesinden 95-bp bölgeyi amlifiye eden *Rap1* F ve *Rap1* R primerleri ve aynı gen bölgesinden dizayn edilen *Rap1* P probu ile örneklerin Real Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak anabilim dalındaki referans *B. bigemina* izolatu, negatif kontrol olarak ise

steril deiyonize su kullanılmıştır. PCR master mix üreticinin açıklamalarına göre toplam 25 µl hacimde aşağıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

Brilliant II QPCR Master Mix	12,5 µl
<i>Rap1</i> F (10 pmol)	1,0 µl
<i>Rap1</i> R (10 pmol)	1,0 µl
<i>Rap1</i> P (10 pmol)	1,0 µl
Genomik DNA (50 ngr)	1,0 µl
PCR Grade Deiyonize su	8,5 µl

B. bigemina için kullanılan termal profil aşağıda gösterilmiştir (109).

1. 50 °C 2dk } 1 siklus [uracil N-deglycosylase digest]
2. 95 °C 10dk } 1 siklus
3. 95 °C 20s } 45 siklus
4. 55 °C 1dk }

Real Time PCR analizinde kullanılan Primer, Prob dizileri ile reporter ve quencher boyalar Tablo 3.7’de gösterilmiştir.

Tablo 3.7. Real Time PCR’da Kullanılan Primer ve Problar

	Primer/Prob		Dizilimi (5'---3')	Referans
<i>B. bigemina</i>	Primer	Rap1 F	TCAGCGACTACGTCCATTTG	Orijinal Dizayn (AB586126, AF017298, M85187)
		Rap1 R	AATCAACTTGGCAGGGTCAG	Orijinal Dizayn (AB586126, AF017298, M85187)
	Prob	Rap1 P	HEX- CCGCGTACAAGAGGTGGTACAGGAA- BHQ1	Orijinal Dizayn (AB586126, AF017298, M85187)
<i>B.bovis</i>	Primer	Msa2c 2F	GGACAAATTAAGCAACCTATACAAA	145
		Msa2c 2R	AGCTTTCCTTGTTTCGAATTTTATAA	145

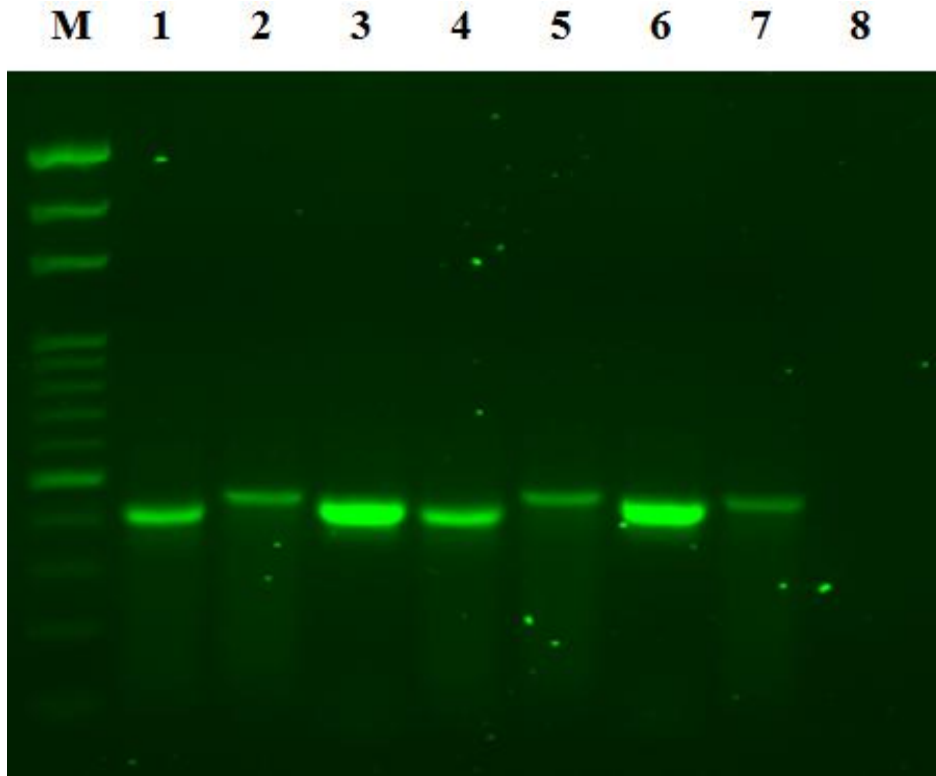
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sığırda *Babesia* enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılan yöntemlerin istatistiksel olarak sensitivite ve spesifiteleri ilgili referansa göre belirlenmiştir (147). Testler arasındaki uyumun belirlenmesinde Kappa testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

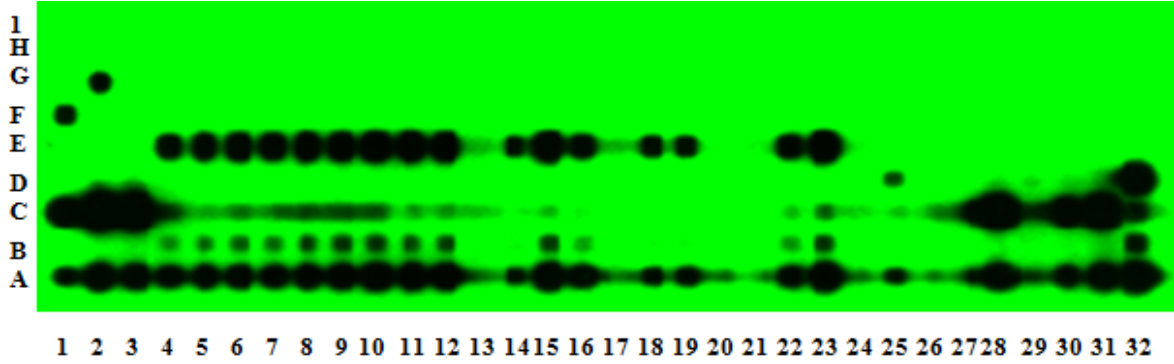
4.1. RLB SONUÇLARI

Reverse line blotting testinde kullanılan ampikonları elde etmek amacıyla yapılan PCR reaksiyonunda sığır piroplasm etkenlerinin 18S rRNA geninin değişken V4 bölgesinden büyüklüğü yaklaşık 390 ile 430 bp arasında değişen bir parçayı amplifiye eden genel primerler kullanılarak pozitif bulunan örneklerin %1,5'lik jel agarozdaki görüntüleri Şekil 4. 1'de verilmiştir.



Şekil 4. 1 Sığır piroplasm türlerinin 18S rRNA gen bölgesinden ~390-430 bp'lık bölgenin amplifikasyonunun jel elektroforezde görünümü (Orijinal). M: Marker (100 bp); 1-6: Pozitif örnekler; 7: Pozitif kontrol; 8: Negatif kontrol

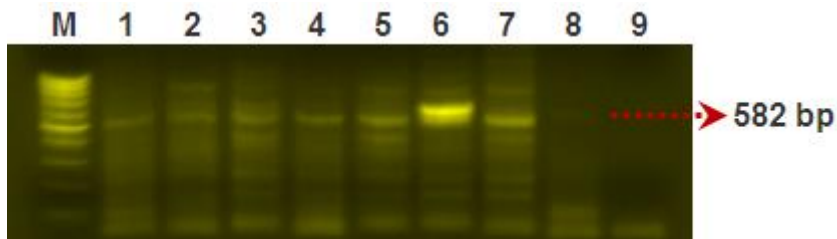
RLB testi ile incelenen toplam 400 sığıra ait kan numunelerinin sonuçları Tablo 4. 1'de gösterilmiştir. RLB analizi sonucu pozitif belirlenen bazı örneklerin hiperfilm üzerindeki görüntüsü Şekil 4. 2'de verilmiştir. RLB sonuçlarına göre 400 sığırdan toplam 18'inin (%4,50) *B. bovis*, 59'unun (%14,75) *B. bigemina*, 16'sının (%4,00) *Babesia* sp. ve 2'sinin (%0,50) *B. bovis* ve *B. bigemina* miks enfekte olduğu belirlenmiştir.



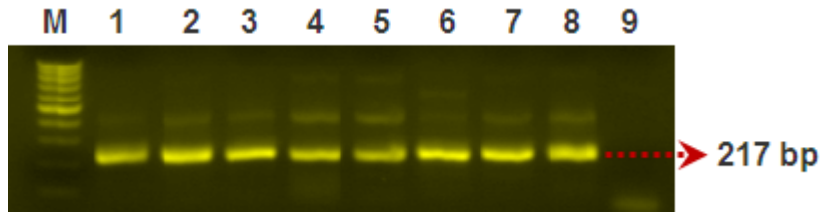
Şekil 4.2. RLB sonuçlarının görüntüsü (Orijinal). (A) Catch-all, (B) *Theileria* spp., (C) *Babesia* spp., (D) *T. annulata*, (E) *T. orientalis*, (F) *B. bovis*, (G) *B. bigemina*, (H) *B. divergens*, (I) *B. major*; 1-31: Pozitif ve negatif örnekler, 32: Pozitif kontrol

4.2. NESTED PCR SONUÇLARI

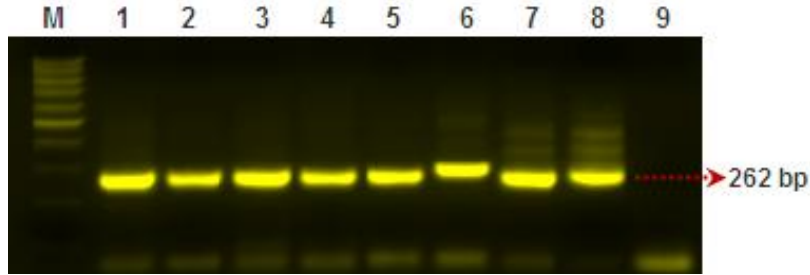
Nested PCR testi ile incelenen toplam 400 sığıra ait kan numunelerinin sonuçları Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Nested PCR'ın 1. PCR basamağında *Babesia bovis* ve *B. bigemina*'nın 18S rRNA gen bölgesinden yaklaşık 582bp bölgeyi amplifiye eden KB-16 ve KB-17 primerleri ile analiz sonucu pozitif belirlenen izolatların jel agarozdaki görünüşleri Şekil 4.3'de; Nested PCR'ın 2. PCR basamağında *B. bigemina* için 18S rRNA gen bölgesinden 262 bp'lık bölgeyi amplifiye eden KB-18 ve KB-19 primerleriyle ve *B. bovis* için ise 18S rRNA gen bölgesinden 217 bp'lık bölgeyi amplifiye eden KB-24 ve KB-25 primerler ile analiz sonucu pozitif belirlenen izolatların jel agarozdaki görünüşleri sırasıyla Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de verilmiştir. Nested PCR sonuçlarına göre 400 sığırdan toplam 23'ünde (%5,75) *B. bovis*, 71'inde (%17,75) *B. bigemina* ve 7'sinde (%1,75) ise *B. bovis* + *B. bigemina* miks enfeksiyon saptanmıştır.



Şekil 4. 3. Nested PCR analizinin 1. PCR basamağında pozitif belirlenen örneklerin agaroz jel üzerindeki görünümü. M: Marker (100bp), 1-7: Pozitif örnekler, 8: Pozitif kontrol, 9: No DNA



Şekil 4. 4. Nested PCR analizinin 2. PCR basamağında *B. bovis* pozitif belirlenen örneklerin agaroz jel üzerindeki görünümü. M: Marker (100bp), 1-7: Pozitif örnekler, 8: Pozitif kontrol, 9: No DNA



Şekil 4. 5. Nested PCR analizinin 2. PCR basamağında *B. bigemina* pozitif belirlenen örneklerin agaroz jel üzerindeki görünümü. M: Marker (100bp), 1-7: Pozitif örnekler, 8: Pozitif kontrol, 9: No DNA

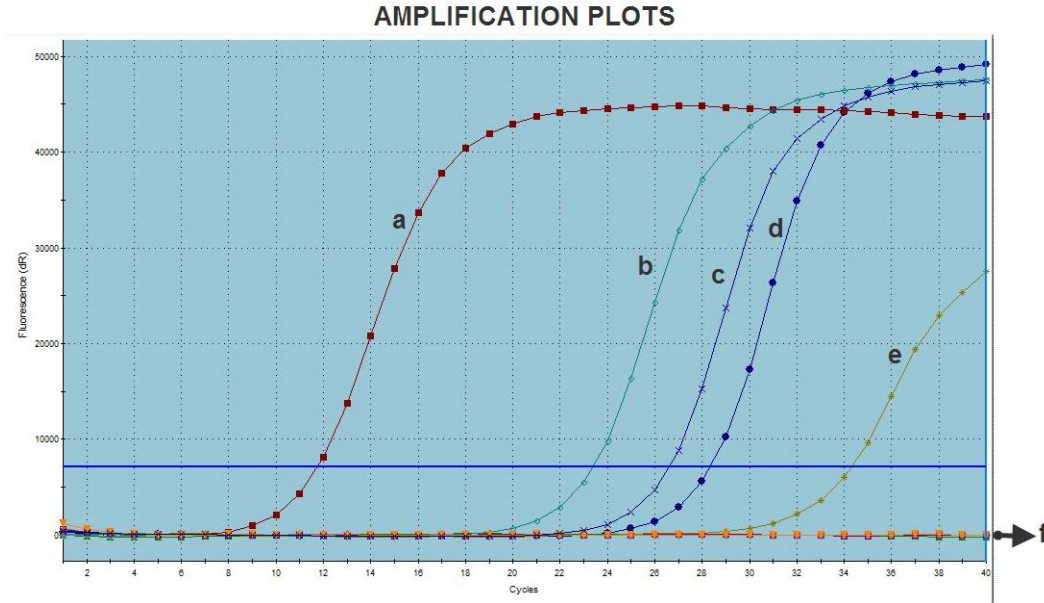
4.3. REAL TIME PCR SONUÇLARI

Real Time PCR ile incelenen toplam 400 sığira ait kan numunelerinin sonuçları Tablo 4. 1'de gösterilmiştir. Sybergreen tabanlı QPCR'da FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) Mix (Roche Diagnostics, Germany) kullanılarak *B. bovis*'in *Msa2c* gen bölgesinden 97-bp bölgeyi amlifiye eden *Msa2c* 2F, *Msa2c* 2R primerleri ile örneklerin Real Time PCR analizleri sonucu pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon ve melting eğrileri Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Pozitif örneklerde ortalama çözünme sıcaklığı (T_m) $78,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$) belirlenmiştir. TaqMan prob tabanlı QPCR'da Brilliant II QPCR Master Mix (Stratagene, Agilent Technologies, USA) kullanılarak *B. bigemina*'nın RAP-1 gen bölgesinden 95-bp bölgeyi amlifiye eden *Rap1* F ve *Rap1* R primerleri ve aynı gen bölgesinden dizayn edilen *Rap1* P probu ile örneklerin amplifikasyon eğrileri Şekil 4. 8'de verilmiştir.

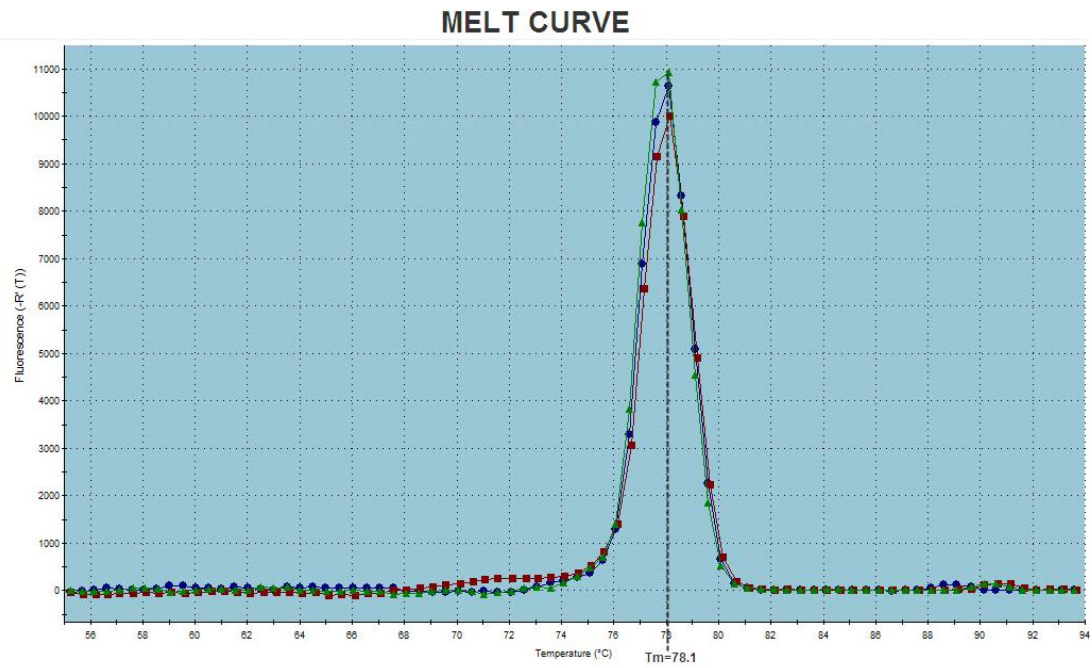
Saptanan Ct (dR) (Eşik değer siklusu) değerleri *B. bigemina* için Şekil 4. 9, *B. bovis* için Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

Babesia bigemina'nın *Rap1* gen bölgesinden dizayn ettiğimiz primer ve problemlerin GenBank'a kayıtlı tüm *B. bigemina* *Rap1* izolatları ile alignmentları Şekil 4.11'da gösterilmiştir. *Rap1f* primerini M85186 izolatı ile %95, diğer tüm izolatlar ile %100; *Rap1r* primerinin ise AF017284 ve AF017294 izolatları ile %95, diğer tüm izolatlar ile

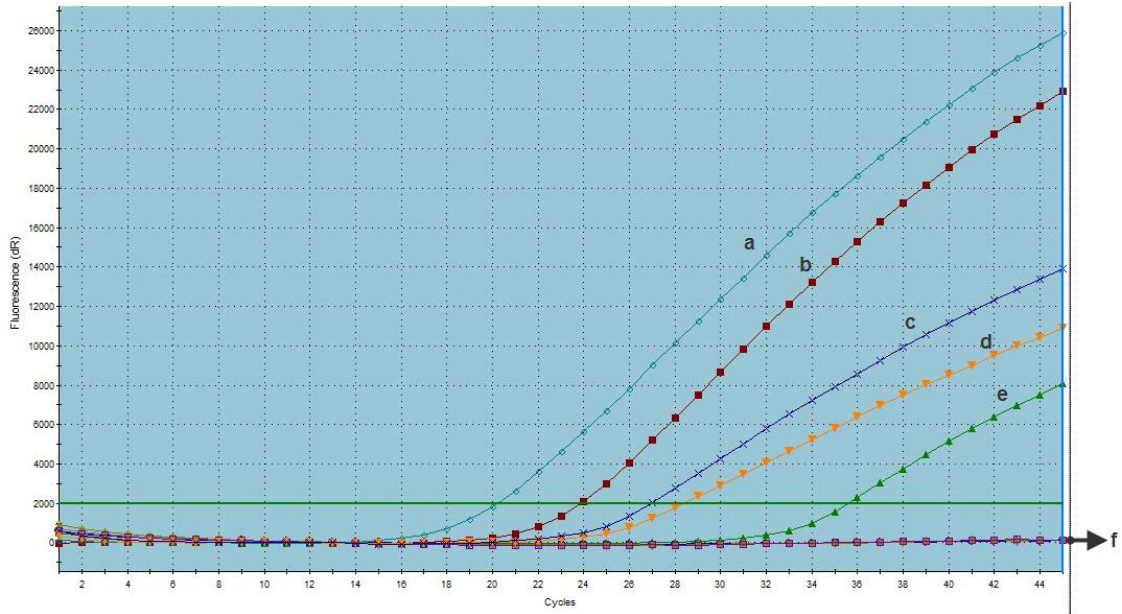
%100 identik olduğu belirlenmiştir. Rap1p probu ise tüm izolatlarla %100 identiklik göstermiştir. Yapılan Blastn ve Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) analizleri sonucu dizayn edilen primer ve problemlerin *B. bigemina* spesifik olduğu teyit edilmiştir. Bunun yanında laboratuarda mevcut *B. bovis*, *T. orientalis* ve *T. annulata* referans izolatları ile yapılan Real Time PCR analizinde de söz konusu izolatlar ile herhangi bir amplifikasyon olmadığı görülmüştür (Şekil 4. 8).



Şekil 4. 6. Sybergreen Real Time PCR analizleri sonucu *B. bovis* pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon grafikleri. a,b,c,d,e: *B. bovis* pozitif örnekler; f: No DNA, *B. bigemina*, *T. annulata*, *T. orientalis*

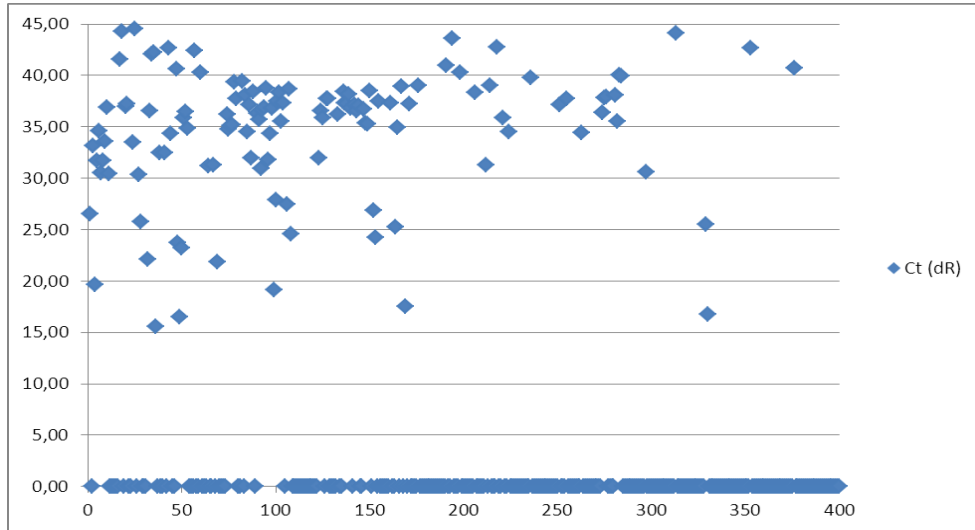


Şekil 4. 7. Sybergreen Real Time PCR analizleri sonucu *B. bovis* pozitif saptanan örneklerin erime eğrileri (melting curve); Tm=78,1

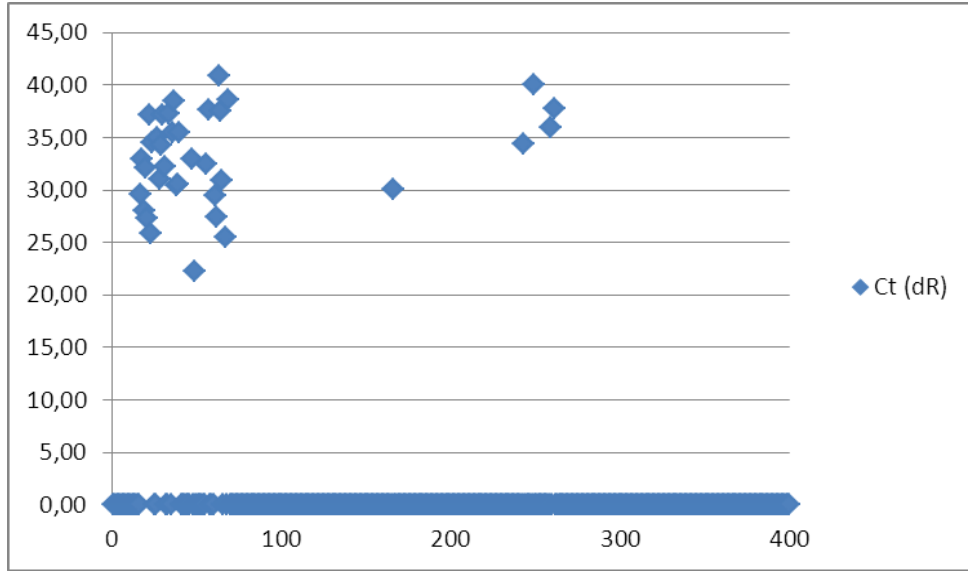


Şekil 4. 8. TaqMan Prob bazlı Real Time PCR analizleri sonucu *B. bigemina* pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon eğrileri. a,b,c,d,e: *B. bigemina* pozitif örnekler; f: No DNA, *B. bovis*, *T. annulata*, *T. orientalis*

Real Time PCR sonuçlarına göre 400 sığırdan toplam 23'ünde (%5,75) *B. bovis*, 75'inde (%18,75) *B. bigemina* ve 9'unda ise (%2,00) *B. bovis* + *B. bigemina* miks enfeksiyon saptanmıştır.



Şekil 4. 9. Real Time PCR'da *B. bigemina* pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı

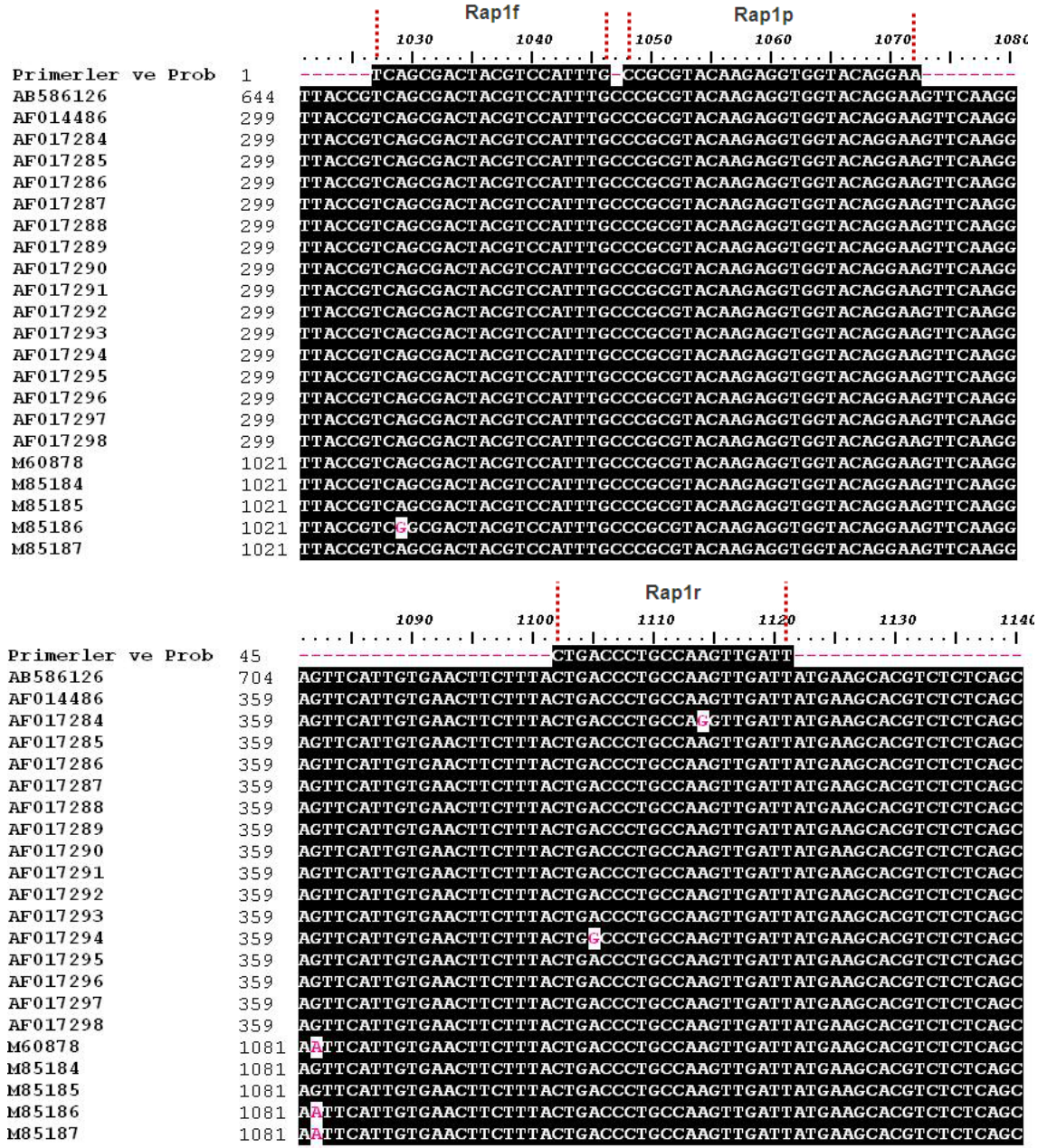


Şekil 4. 10. Real Time PCR’da *B. bovis* pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı

Tablo 4. 1. İncelemesi yapılan sığırlarda Nested PCR, RLB ve Real Time PCR yöntemlerine göre belirlenen *Babesia* pozitifliklerinin dağılımı

[illegible]

Erzurum	13	0	0,00	1	0,25	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,25	0	0,00
Antalya	30	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Adana	21	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Kahramanmaraş	10	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Zonguldak	9	0	0,00	1	0,25	0	0,00	0	0,00	1	0,25	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,25	0	0,00
Burdur	22	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Kayseri	10	0	0,00	10	2,50	0	0,00	0	0,00	10	2,50	0	0,00	0	0,00	0	0,00	10	2,50	0	0,00
Kastamonu	3	1	0,25	0	0,00	1	0,25	1	0,25	0	0,00	1	0,25	0	0,00	1	0,25	0	0,00	1	0,25
Samsun	4	1	0,25	0	0,00	2	0,50	1	0,25	0	0,00	1	0,25	1	0,25	1	0,25	0	0,00	3	0,75
Bursa	2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Aydın	1	0	0,00	1	0,25	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,25	0	0,00	0	0,00	1	0,25	0	0,00
Toplam	400	23	5,75	71	17,75	7	1,75	18	4,50	59	14,75	16	4,00	2	0,50	23	5,75	75	18,75	9	2,00



Şekil 4. 11. *B. bigemina*'nın Rap1 gen bölgesinden dizayn edilen primerler ve probun, GenBank'a kayıtlı diğer *B. bigemina* sekans dizileri ile multiple alignmentları

4.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sığırlarda *Babesia* enfeksiyonlarının teşhisinde RLB, Nested PCR ve Real Time PCR tekniklerinin etkinlikleri açısından yapılan istatistiksel analiz Tablo 4. 2'de verilmiştir. Bu değerlendirmede gold test Real Time PCR olarak alınmıştır. Nested PCR tekniğinin Real Time PCR tekniği ile kıyaslanması sonucu %94,4 sensitivite (% 88,3-97,4; %95 Güven aralığı) ve %100,0 spesifite (% 98,7-100,0; %95 Güven aralığı) gösterdiği

belirlenmiştir. RLB tekniğinin Real Time PCR tekniği ile kıyaslanması sonucu ise %88,8 sensitivite (% 81,4-93,5; %95 Güven aralığı) ve %100,0 spesifite (% 98,7-100,0; %95 Güven aralığı) gösterdiği belirlenmiştir. Kappa testi ile Real Time PCR ve Nested PCR arasında %96,1 ($p<0,05$), Real Time PCR ve RLB arasında %92,1 ($p<0,05$) ve Nested PCR ile RLB arasında ise %95,9 ($p<0,05$) oranında uyum saptanmıştır. RLB testinde *Babesia* sp. olarak belirlenen 16 örneğin hem Real Time hem de Nested PCR'da 5'inin *B. bigemina*, 9'unun *B. bovis*, 2'sinin ise *B. bovis* + *B. bigemina* miks olduğu ortaya konmuştur. Nested PCR'da negatif belirlenen 6 örneğin Real Time PCR'da Ct (dR) (Eşik değer siklusu) değerlerinin 40'tan büyük olduğu görülmüştür.

Tablo 4. 2. Babesiosis'in teşhisinde kullanılan tekniklerin Gold Teste göre sensitivite ve spesifiteleri

		Real Time PCR (Gold Test)			Sensitivite (%95 güven aralığı)	Spesifite (%95 güven aralığı)
		+	-	Toplam		
RLB	+	95	0	95	0,888 (0,814-0,935)	1,000 (0,987-1,000)
	-	12	293	305		
	Toplam	107	293	400		
Nested PCR	+	101	0	101	0,944 (0,883-0,974)	1,000 (0,987-1,000)
	-	6	299	305		
	Toplam	107	299			

TARTIŞMA VE SONUÇ

Babesiosis'in teşhisinde eskiden beri mikroskopik muayene ve serolojik teşhis yöntemleri (IFAT, ELISA vb.) kullanılmıştır. Ancak hızla ilerleyen teknolojiyle birlikte son yıllarda nükleik asit tabanlı teşhis yöntemleri (PCR, RLB, Real-Time PCR vb.) babesiosis'in teşhisinde kullanılmaya başlanmıştır. Her tanı yönteminin kendi içerisinde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (77, 92). *Babesia* türlerinin tespit edilmesinde mikroskopik muayene yetersiz kalabilmektedir. Hastalığı atlatmış hayvanlar vücutlarında çok az da olsa etkeni taşıyabilmektedir. Dolayısıyla bu durumdaki hayvanların kanlarından yapılan frotilerde etkenin saptanması çok zor olabilmektedir. Kanda etken görülse dahi, bunun hangi tür olduğunun tespiti de yanıltıcı durumlar doğurabilir. Ayrıca mikroskopik muayene için deneyimli personele ihtiyaç bulunmaktadır (95, 148). Babesiosis'in teşhisinde sıklıkla kullanılan ve parazite karşı oluşan antikorların tespiti amacıyla kullanılan serolojik yöntemlerin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Sığır kanında etken bulunmasa dahi parazite ait antikorlar varlığını sürdürebilmekte, dolayısıyla teşhiste yanlış veya çapraz pozitifliklere sebep olmaktadır (64, 105).

Son yıllarda mikroskopik ve serolojik teşhis yöntemlerindeki bu sıkıntıları gidermek amacıyla, parazitin DNA'sını veya RNA'sını tespit etmeye yönelik moleküler teşhis yöntemleri geliştirilmiştir. Moleküler teşhis yöntemleriyle birlikte tespit edilen parazit türlerinin çeşitli gen bölgelerine göre moleküler karakterizasyonları yapılmakta ve Dünya'nın çeşitli bölgelerindeki aynı tür parazitlerle akrabalık dereceleri saptanmaktadır (67, 73, 122, 123, 130, 132, 137).

Sığırlarda babesiosis'e yol açan türlerin en önemlilerinden olan *B. bovis* ve *B. bigemina*, Dünya'da Güney Avrupa, Orta Doğu ve Rusya, Güney Amerika ve Afrika'da yaygın olarak görülmektedir (2, 8, 149).

Türkiye'de direkt PCR ile sığırlarda babesiosis'in teşhisi ilk defa Tanyüksel ve ark. (66) tarafından yapılmış olup *B. bigemina* Ankara yöresinde %8,45, Burdur yöresinde %8 ve Kayseri yöresinde %5 olarak bildirilmiştir. Bunu takiben ilk kez RLB tekniği ile yapılan bir saha çalışmasında (60), Ankara yöresinde *B. bigemina* pozitifliği %6 olarak saptanmıştır. Kayseri yöresinde sığırlarda RLB ile *B. bigemina*'nın moleküler

prevalansı %0,6 (67) ve yine Kayseri’de sığır barınaklarından toplanan kenelerde RLB ile *B. bigemina*’nın moleküler prevalansı %14 olarak tespit edilmiştir (68). Doğu Karadeniz Bölgesi’nde sığırlar üzerinde RLB tekniği ile yapılan moleküler çalışmada *B. bigemina* %0,77 oranında tespit edilmiştir (71). Karadeniz Bölgesi’nde RLB ile yapılan diğer bir saha çalışmasında ise *B. bigemina* prevalansı %2,2 olarak bildirilmiştir (83). Bu çalışmada ise Türkiye’nin farklı illerindeki sığırlardan elde edilmiş olan 400 adet kan örneğinde, RLB ile %14,75, Nested PCR ile %17,75 ve Real Time PCR ile %18,75 oranında *B. bigemina* pozitifliği belirlenmiştir. Ayrıca RLB testinde *Babesia* sp. olarak belirlenen 16 örnekten 5’inin Nested PCR ve Real Time PCR ile *B. bigemina* 2’sinin ise *B. bigemina*+*B. bovis* miks olduğu ortaya konmuştur.

Türkiye’de *B. bovis*’in moleküler prevalansı incelendiğinde; PCR ile sığırlarda babesiosis’in teşhisinin ilk defa Tanyüksel ve ark. (66) tarafından yapıldığı görülmektedir. *Babesia bovis*’in moleküler prevalansı konusunda Türkiye’de sınırlı sayıda çalışma olup; PCR ile Ankara yöresinde %12,68, Burdur yöresinde %8 ve Samsun yöresinde %3,85 (66); RLB ile Ankara yöresinde %2,3 (60) ve %3,6 (59), Trakya Bölgesi’nde %1,3 (82), Ege Bölgesi’nde %1,02 (84) *B. bovis* tespit edilmiştir. Karadeniz Bölgesi’nde RLB ile yapılan diğer bir çalışmada (83) *B. bovis*’in moleküler prevalansı; Amasya’da %4; Bartın’da %2,3, Bolu’da %4,2, Giresun’da %1,6, Karabük’te %1,4, Kastamonu’da %5,6, Samsun’da %3,8 ve Trabzon’da %2,2 olarak belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada (83) genel olarak Karadeniz Bölgesi’nde *B. bovis*’in moleküler prevalansı %1,8 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise 400 adet kan örneğinde, RLB ile %4,50, Nested PCR ile ve Real Time PCR ile %5,75 oranında *B. bigemina* pozitifliği belirlenmiştir. Ayrıca RLB testinde *Babesia* sp. olarak belirlenen 16 örnekten 9’unun Nested PCR ve Real Time PCR ile *B. bovis* olduğu ortaya konmuştur.

RLB yöntemi, PCR ürünlerinin bir membranda ayrı sıralara bağlanmış özgün problara hibridizasyonu esasıyla çalışmaktadır. Teknik birçok etkeninin aynı anda bir çok prob ile karşılaştırılmasına imkan sağladığından oldukça pratik ve kullanışlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu yöntem ilk defa 1988 yılında insanlarda, orak hücre anemisi ile β Talasemi’nin teşhisinde kullanılmıştır (150). Rijpkema ve ark. (151), aynı anda kenede bulunabilen 4 *Borrelia* türünün ayrılması ve eş zamanlı teşhisi için bu tekniği kullanmışlardır. Daha sonra Kamerbeek ve ark. (152), aynı yöntem ile *Mycobacterium*

tuberculosis'in teşhisini ve tiplendirmesini yapmışlardır. Bu yöntemin kan protozoonlarının teşhisinde kullanılması, Gubbels ve ark. (64) tarafından gerçekleştirilmiş olup, 18 ssrRNA geninin V4 değişken bölgesini çoğaltan primerler ile PCR'da çoğalttıkları ampliconları, RLB tekniğinde kullanarak sığırlarda görülen *Theileria annulata*, *T. parva*, *T. mutans*, *T. tautrogi*, *T. velifera*, *B. bovis*, *B. bigemina* ve *B. divergens*'in eş zamanlı özgül teşhislerinin yapılabileceğini göstermişlerdir. Sahip olduğu avantajları sebebi ile son yıllarda dünyada ve Türkiye'de sığır babesiosis'inin teşhisinde yaygın olarak kullanılan bu teknikte DNA miktarının düşüklüğü ve hedef bölgenin büyüklüğüne göre yalancı negatiflikler ve soy düzeyinde pozitiflik saptanmasına karşın tür yalancı negatiflikleri gibi dezavantajlar ortaya çıkabilmektedir (145, 146). Nitekim bu çalışmada incelenen örneklerden 12'si RLB testi ile negatif belirlenmiş, 16'sı ise *Babesia* sp. düzeyinde pozitiflik verirken, tür düzeyinde reaksiyon vermemiştir. Bu sonuçlarla RLB testinin, gold standart test olarak alınan Real Time PCR testine göre sensitivitesi %88,8 olarak belirlenmiştir. Saptanan bu sensitivite değeri Nested PCR ve Real Time PCR yöntemlerine oranla düşük olmasına karşın genel çerçevede yüksek gözükmemektedir. Bunun yanında RLB testinin spesifitesi ise %100 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar söz konusu testin sığırlarda *B. bovis* ve *B. bigemina* enfeksiyonlarının teşhisinde güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

Nested PCR yöntemi, standart PCR'a farklı primer takımlarıyla ikinci bir amplifikasyon uygulanması esasına dayanan moleküler bir tekniktir. İlk amplifikasyonda elde edilen ürün ikinci PCR aşamasında kalıp olarak kullanılır. Kullanılan ikinci primer takımı hedef diziye özgüdür. Kompleks mikrobiyal popülasyonlara ait hedef dizilerin spesifik bir şekilde amplifikasyonu klasik PCR yöntemleriyle bazen mümkün olmadığı görülmekte ve oluşan non-spesifik fragmentlerin amplifikasyonu sonucu yanlış pozitiflikler ortaya çıkabilmektedir. Nested PCR ile söz konusu bu olumsuzluk giderilebilmekte, aynı zamanda düşük DNA'ya sahip örneklerin ikinci kez PCR uygulaması ile teşhisleri mümkün olabilmektedir (146, 153). Son yıllarda ruminant ve vektör kenelerde babesiosis'in spesifik teşhisinde nested PCR yönteminin sıklıkla uygulandığı görülmektedir (146, 154, 155). Hartelt ve ark. (156), *Ixodes ricinus* kenelerinde *Babesia* sp. araştırılması amacı ile 18S rRNA bölgesinden dizayn ettikleri primerlerin spesifitelerinde olumsuzluklar belirlemişlerdir. Nitekim söz konusu primerlerin blastn analizi sonucu *B. bigemina* ve *B. bovis* teşhisi için yeterli spesifitede

olmadığı da görülmüştür. Calder ve ark. (157), *B. bovis*'in sığırlarda PCR ile spesifik teşhisi için dizayn ettikleri primerlerin blastn analizi sonucu dizilim uyumsuzluğu gösterdiği ve bu durumda teşhis zorluklarına ve yanlış negatifliklere yolaçabileceği belirtilmiştir (146). Benzer şekilde Oliveira-Sequeria ve ark. (158), tarafından dizayn edilen nested primerlerinin de dizilim uyumsuzluğu gösterdiği ve spesifitesinin düşük olduğu kaydedilmiştir (146). Bu çalışmada tercih edilen ve Guerrero ve ark. (146) tarafından dizayn edilen nested primerlerinin, araştırmacıların belirttiği gibi blastn analizi sonucu yüksek spesifite gösterdiği ve dizilimlerin GenBank'a kayıtlı tüm *B. bovis* ve *B. bigemina* 18S rRNA dizilimleri ile uyumluluk gösterdiği görülmüştür. Bu çalışmada kullanılan nested PCR yönteminin sığır babesiosis'inin teşhisindeki sensitivitesi gold standart Real Time PCR testine göre %94,4, spesifitesi ise %100 belirlenmiştir. RLB testinde negatif belirlenen 6 örnek nested PCR ile pozitif belirlenmiş, ayrıca soy düzeyinde RLB ile pozitif belirlenen 16 örneğin bu test ile tür bazlı pozitif verdiği saptanmıştır. Bu çalışmada kullanılan Nested PCR yönteminin göstermiş olduğu sensitivite ve spesifite ile sığırlarda *B. bovis* ve *B. bigemina* enfeksiyonlarının teşhisinde güvenilir bir şekilde kullanılabileceği görülmektedir.

Real-time PCR tekniği, hızı, sensitivite ve spesifitesi, seçiciliği, hedef patojen veya gen bölgesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi ve otomasyona uygun olması gibi nedenlerle son yıllarda öne çıkan tekniklerin başında gelmektedir. Ayrıca söz konusu teknik ile mutasyon analizleri ve gen ekspresyonları da hassas bir şekilde belirlenebilmektedir. Son yıllarda sığır babesiosis'inin spesifik teşhisinde de kullanılmaya başlayan *Babesia* türlerinin 18S rRNA, mitokondrial cytochrome b ve msa2c gibi farklı gen bölgeleri hedef alınarak spesifik primer ve probalar ile araştırmaların yapıldığı görülmektedir (109, 144, 145).

Kim ve ark., (109), *B. bovis* ve *B. bigemina* 'nın 18S rRNA bölgesinden dizayn ettikleri primer ve probalar ile TaqMan tabanlı Real-time PCR araştırmasında, her iki etken için saptama limitini 2,5 parazit/µl belirlemişler, *B. bovis* için Nested PCR kıyaslamasında sensitiviteyi %96,9, spesifiteyi %100; *B. bigemina* için ise hem sensitivite hem de spesifiteyi %100 saptamışlardır. Criado-Fornelio ve ark. (144), iki farklı qPCR yönteminin sığır babesiosis'inin teşhisindeki etkinliğini araştırmışlar, hem TaqMan prob hem de FRET prob bazlı qPCR denemelerinde yüksek sensitivite ve spesifite

belirlemişlerdir. Her iki teknik için de saptama limitini (linear kalibrasyon eğrileri) 0,1fg/μl-0,01ng/μl olarak saptamışlardır. Saha örnekleri üzerinde iki tekniğin uygulanması sonucu, spesifitelerinin %100 olmasına karşın sensitivitenin TaqMan prob bazlı qPCR yönteminde daha yüksek belirlediklerini kaydetmişlerdir. Ramos ve ark. (145), *B. bovis*'in msa2c gen bölgesini hedef alarak dizayn ettikleri sybergreen tabanlı qPCR tekniğinin teşhisteki etkinliğini ortaya koyma amacı ile yaptıkları çalışmada blastn analizi sonucu ve *B. bigemina*, *A. marginale* ve *Bos taurus* referans DNA'larını kontrol olarak kullanarak dizayn ettikleri primerlerin tür spesifik olduğunu belirlemişlerdir. Msa2c qPCR tekniğinin saptama limitini, msa2c kopya sayısı ve eşik değer siklusu arasındaki linear korelasyona göre ml kanda 1000 kopya olarak saptamışlardır. Çalışmada ortalama çözünme sıcaklığı (Tm) 77,41°C (±0,25°C) saptanmıştır. Araştırmacılar qPCR'ın sensitivitesini konvansiyonel PCR'a göre yüksek belirlemişler ve iki teknik arasındaki uyumu %88,8 (Kappa indeks=0,75) bulmuşlardır. Bu çalışmada ise Real Time PCR teknikleri ile RLB testine göre 12, Nested PCR testine göre ise 6 örnek pozitif belirlenmiş olup RLB testinde soy düzeyinde pozitiflik veren örneklerin hepsinin tür identifikasyonları yapılmıştır. Ayrıca Nested PCR'da negatif belirlenen 6 örneğin Real Time PCR'da Ct (dR) (Eşik değer siklusu) değerlerinin yüksek olduğu (>40) belirlenmiş ve neticede bu örneklerde paraziteminin oldukça düşük olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen bu sonuçlarla sensitivite ve spesifite hesaplamalarında Real Time PCR tekniği standart gold test olarak alınmıştır. Kappa testi ile Real Time PCR ve Nested PCR arasında %96,1 (p<0,05), Real Time PCR ve RLB arasında %92,1 (p<0,05) ve Nested PCR ile RLB arasında ise %95,9 (p<0,05) oranında uyum saptanmıştır. Elde edilen sonuçların araştırmacıların (109, 144, 145) bulguları ile uyum gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte Ramos ve ark. (145) tarafından dizayn edilen syber green tabanlı qPCR primerlerinin spesifiteleri blastn analizleri ve Anabilim Dalı cryobankında mevcut olan *B. bigemina*, *T. annulata* ve *T. orientalis* referans DNA'ları kullanılarak konfirme edilmiştir. Bu çalışmada *B. bovis* için bulunan 78,1 °C (±0,2 °C) Tm değeri Ramos ve ark. (145) tarafından bildirilen Tm değeri ile uyum göstermiştir. Apicomplexan protozoonların apikal organellerinden salgılanan proteinler, parazitin konak hücresi içerisine invaze olmasında ve hücre içinde kalmasında çok önemli rol oynar (159). Bu proteinler arasında rhoptry-associated protein-1 (*rap-1*) gen familyası, özellikle *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina* türlerinde

tam olarak ortaya konmuş olmakla birlikte, diğer tüm *Babesia* türlerinde de bulunduğu kaydedilmiştir (160-163). Rap-1 gen familyası proteinleri, sahip olduğu çeşitli immünolojik epitoplarla spesifik antikorların oluşumuna yol açmakta ve oluşan spesifik antikorların da merazoitlerin sağlam eritrositlere invaze olmasını engellediği gösterilmiştir (164-166). Bu yüzden söz konusu proteine ait Rap-1 gen bölgesi *B. bovis* ve *B. bigemina* türlerinin moleküler tiplendirilmesinde ve çeşitli aşı çalışmalarında temeli teşkil etmiştir. Bu çalışmada *Babesia bigemina*'nın Rap-1 gen bölgesi hedef alınarak primer ve prob dizaynı yapılmış ve dizilimlerin GenBank'a kayıtlı tüm *B. bigemina* Rap-1 izolatları ile alignmentları gerçekleştirilmiştir. Blastn ve Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) analizleri sonucu dizayn edilen primer ve problemlerin *B. bigemina* spesifik olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca laboratuarda mevcut *B. bovis*, *T. orientalis* ve *T. annulata* referans izolatları ile yapılan Real Time PCR analizinde de söz konusu izolatlar ile herhangi bir amplifikasyon olmadığı saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar, dizayn edilen primerler ve probun *B. bigemina* enfeksiyonlarının Real Time PCR ile spesifik teşhisinde güvenle kullanılabileceğini göstermiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile sığırlarda *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın araştırılmasında Real Time PCR yönteminin Nested PCR ve RLB tekniklerine oranla daha duyarlı olduğu ortaya konmuştur. Bunun yanında her üç tekniğin de bu enfeksiyonların teşhisinde oldukça spesifik olduğu saptanmış olup, nested PCR ve RLB testlerinin sensitivitelerinin de oldukça yüksek olduğu ve teşhiste güvenli bir şekilde kullanılabilecekleri görülmüştür. Real Time PCR tekniğinin, sahip olduğu yüksek sensitivite ve spesifitenin yanında, eş zamanlı ve hızlı teşhise imkan sağlamasının yanında kantitasyona olanak sağlaması, paraziteminin saptanabilmesi, dolayısıyla tedavi etkinliğinin takibi ve kontaminasyon riskinin minimize olması gibi artıları ile öne çıktığı görülmüştür.

6. KAYNAKLAR

1. McCosker JP. The global importance of babesiosis. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press 1981; pp 1-24.
2. Kuttler KL, Clifford DJ, Touray BN. Prevalance of anaplasmosis and babesiosis in N'Dama cattle of the Gambia. Trop Anim Hlth Prod 1988; 20(1): 37-41.
3. Angus B. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. Int J Parasitol 1996; 26: 1341-1355.
4. Uilenberg G. *Babesia* – A historical overview. Vet Parasitol 2006; 138: 3-10.
5. İnci A. Orta Anadolu Bölgesinde Sığır Babesiosisi, XV. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Kayseri ve Ürgüp 18-23 Kasım 2007, ss 77-78.
6. Systema Naturae 2000, The Taxonomicon, Universal Taxonomic Services, Amsterdam. Erişim: [<http://sn2000.taxonomy.nl/>], Erişim Tarihi: 08.01.2010
7. Oosthuizen MC, Zwegarth E, Collins NE, et al. Identification of a novel *Babesia* sp. from a sable antelope (*Hippotragus niger* Harris, 1838). J Clin Microbiol 2008; 46(7): 2247-2251.
8. Purnell RE. Babesiosis in various hosts. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press 1981; pp 25-64.
9. Allsopp MT, Cavalier-Smith T, De Waal DT, Allsopp BA. Phylogeny and evolution of the piroplasms. Parasitology 1994; 108: 147-152.
10. Allsopp MT, Allsopp BA. Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. Ann N Y Acad Sci 2006; 1081: 509-517.
11. Rudzinska MA. Host-cell-parasite relationships. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press 1981; pp 88-135.
12. Mehlhorn H, Schein E. The piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages. In: Baker JR, Muller R (eds), Advances in Parasitology. Academic Press 1984; pp 69-89.
13. Friedhoff KT. Transmission of Babesia. In: Ristic M (ed), Babesiosis of Domestic Animals and Man, Boca Raton, Florida, CRC Press 1988; pp 23-52.

14. Mackenstedt U, Gauer M, Fuchs P, et al. DNA measurements reveal differences in the life cycles of *Babesia bigemina* and *B. canis*, two typical members of the genus *Babesia*. *Parasitol Res* 1995; 81: 595-604.
15. De Vos AJ, Dalgliesh RJ, Callow LL. *Babesia*. In: Soulsby EJJ (ed), *Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis*, Vol. III Boca Raton, CRC Press Inc 1987.
16. Gray JS, Weiss LM. *Babesia microti*. In: Khan N (ed.), *Emerging Protozoan Pathogens*. Taylor and Francis, Abingdon, UK 2008; pp 303-349.
17. Gough JM, Jorgensen WK, Kemp DH. Development of tick gut forms of *Babesia bigemina* in vitro. *J Eukaryot Microbiol* 1998; 45: 298-306.
18. Agbede RIS, Kemp DH, Hoyte HMD. Secretory and digest cells of female *Boophilus microplus*: invasion and development of *Babesia bovis*; light and electron microscope studies. In: Sauer JR, Hair AJ (eds), *Morphology, Physiology and Behavioural Biology of Ticks*. New York, Wiley and Sons 1986; pp 457-471.
19. Bock R, Jackson L, de Vos A, et al. Babesiosis of cattle. *Parasitology* 2004; 129: 247-269.
20. Hoyte HM. Initial development of infectious *Babesia bigemina*. *Aust Vet J* 1961; 8: 462-466.
21. Potgieter FT, Els HJ. Light and electron microscopic observations on the development of *Babesia bigemina* in larvae, nymphae and non-replete females of *Boophilus decoloratus*. *Onderstepoort J Vet* 1977; 44: 213-231.
22. Callow LL, Hoyte HMD. Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* sp. and the tick cattle *Boophilus microplus*. *Aust Vet J* 1961; 37: 381-390.
23. Riek RF. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust J Agr Res* 1964; 15: 802-821.
24. Dalgliesh RJ, Stewart NP, Callow LL. Transmission of *Babesia bigemina* by transfer of adult male *Boophilus microplus* [letter]. *Aust Vet J* 1978; 54: 205-206.
25. Riek RF. The life cycle of *Babesia argentina* (Lignie`res, 1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust J Agr Res* 1966; 17: 247-254.
26. Soulsby EJJ. *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*. Bailliere Tindall. 1986, London.

27. Ekrem İ. Piroplasmoslar hakkında en yeni malumat. Türk Baytarlar Mecmuası 1931; 6: 65-73.
28. Lestoquard M. Piroplasmoslar. Baytari Mecmua 1931; 9: 8-9.
29. Gören S, Yetkin R. Tek tırnaklılarda, sığırdı, koyunda, keçide ve köpekte piroplazmoz. Milli Müd Baytar Bakt Serum ve Aşı Evi Yay 1935.
30. Aysoy S. Piroplasmos (Piroplasmose). Tıbbi Klinik Kılavuzu, Talebe Ders Kılavuzu, Sayı 24, Yüksek Ziraat Enstitüsü Matbaası, Ankara 1941.
31. Mimioğlu M. Samsun, Ordu, Giresun ve Bolu Vilayetlerinde “Haematurai vesicalis bovis”li sığırlarda parasitolojik araştırmalar, Ankara Üniv Vet Fak Derg 1955, 11: 183-192.
32. Kurtpınar H. Erzurum, Kars, Ağrı vilayetlerinde sığır, koyun ve keçilerin yaz aylarına mahsus parazitleri ve bunların doğurduğu hastalıklar. Türk Vet Hek Dern Derg 1956; 26: 3226-3232.
33. Göksu K. Ankara ve civarı sığırlarında theileriosis üzerinde sistematik araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1959; 115: 60.
34. Özcan CH. Ankara ve civarında evcil hayvanlarda görülen Piroplasmose vakaları ve tedavileri üzerinde araştırmalar. Ankara Üniversitesi Basımevi 1961; ss 10-106.
35. Erkut HM. Ege bölgesindeki sığırlarda piroplasmosis durumu ve tedavide yeni ilaçlamalar. Bornova Vet Araş Enst Derg 1967; 8: 120-130.
36. Göksu K. Batı Karadeniz bölgesi illerinin sığırlarında gözlenen *Babesidae* (Sporozoa: Piroplasmida) enfeksiyonları. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1968; 15: 46-57.
37. Göksu K. Doğu Anadolu Bölgesinde hayvanlarda görülen başlıca parazitler hastalıklar ve bunlarla savaşta göz önüne alınacak hususlar. Türk Vet Hek Dern Derg 1969; 39 (4): 13-22.
38. Göksu K. Yurdumuzun çeşitli bölgelerinde sığırlarda Piroplasmida enfeksiyonları (piroplasmossis, babesiosis, theileriosis ve anaplasmosis'in yayılış durumları). Türk Vet Hek Dern Derg 1970; 40 (4): 29-39.
39. Hoffman G, Hörchner F, Schein E, et al. Saisonales auftreten von zecken und piroplasmen bei haustieren in des asiatischen provinzen der Turkei. Berl Münch Tierarztl Wschr 1971; 84: 152-156.
40. Mimioğlu M, Güler S, Ulutaş M. Untersuchungen über die Blutparasiten bei rindem in der Türkei. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1972; 2: 183-192.

41. Tüzer E. İstanbul ili ve çevresinde sığırlarda görülen *Babesia*, *Theileria* ve *Anaplasma* türleri ve bunlardan oluşan enfeksiyonların yayılışı üzerinde araştırma. İstanbul Üniv Vet Fak Derg 1981; 8 (1): 97-110.
42. Dumanlı N, Özer E. Elazığ yöresinde sığırlarda görülen kan parazitleri ve yayılışları üzerinde araştırmalar. Selçuk Üniv Vet Fak Derg 1987; 3(1): 159-166.
43. Sayın F, Friedhoff KT, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A. Beytepe köyünde sığır babesiosisi üzerinde seroepidemiyolojik araştırmalar. 6. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ No:104, İstanbul 1989.
44. Taşçı S. Van bölgesinde sığır ve koyunlarda görülen kene türleri ile bunların taşıdığı kan parazitleri arasındaki ilişkiler. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1989; 36(1): 53-63.
45. Dinçer Ş, Sayın F, Karaer Z, ve ark. Karadeniz bölgesi sığırlarında, bulunan kan parazitlerinin sero-insidensi üzerine araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1991; 38 (1-2): 206-226.
46. İnci A. Ankara'nın Çubuk ilçesinde sığırlarda babesiosis'in seroinsidensi üzerine araştırmalar, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 1991.
47. Özer E, Erdoğan SZ, Köroğlu E, ve ark. Malatya ve Güneydoğu Anadolu illerinde sığır, koyun ve keçilerde bulunan kan parazitleri ve yayılışları. Turk J Vet Am Sci 1993; 17 (3): 209-215.
48. Açııcı M. Samsun ve yöresi sığırlarında kan parazitlerinin yayılışı. Etlik Vet Mik Derg 1995; 8 (1-2): 271-277.
49. İnci A, Çakmak A, Karaer Z, ve ark. Kayseri yöresinde sığırlarda babesiosisin seroprevalansı. Turk J Vet Anim Sci 2002; 26: 1345-1350.
50. Sevinc F, Sevinc M, Birdane MF, et al. Prevalence of *Babesia bigemina* in cattle. Revue de Méd Vét 2001; 152(5): 395-398.
51. Aktaş M, Dumanlı N, Karaer Z, ve ark. Elazığ, Malatya, ve Tunceli illerinde sığırlarda *Babesia* türlerinin seroprevalansı. Turk J Vet Anim Sci 2001; 25 (4): 447-451.
52. Nalbantoğlu S, Vatansever Z, Karaer Z, Cakmak A. The epidemiology of cattle babesiosis in Adana region. Babesia World Summit, December 1-3, Buenos Aires, Argentina 2005.
53. Sevinç F, Özdemir Ö, Coşkun A. Onbir günlük bir buzağıda akut Babesiosis. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2005; 2: 131-135.

54. Çakmak A. Untersuchungen zur inzidenz von haemoparasiten in der provinz Ankara. Tierarztl Hochsch Diss Hannover 1987.
55. Sayın F, Friedhoff KT, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı BA, Eren H. Ankara yöresi sığırlarında kan parazitlerinin sero-insidensi üzerine araştırmalar. 6. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ Özetleri. Tebliğ No:103, İstanbul 1989.
56. Eren H. Ankara yöresinde sığır babesiosisinin sero-prevalansı. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1993; 40 (1): 23-37.
57. Sayın F, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı BA, Eren H, Friedhoff KT, Müller I. Studies on seroprevalence of *Babesia* infection of cattle in Turkey. In: Özcel MA (ed), New dimensions in parasitology, 1996; 20(1):505-516.
58. Vatansever, Z., Nalbantoğlu, S., Çakmak, A. Çukurova bölgesinde sığır babesiosis'nin epidemiyolojisi. 12. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Elazığ 2001.
59. Vatansever Z, İça A, Deniz A, Nalbantoğlu S, Karaer Z, Çakmak A, Sparagano O. Ankara yöresinde sığırlarda kene kaynaklı protozoon enfeksiyonlarının yayılışının reverse line blotting (RLB)ve indirek floresan antikor testi (IFAT) ile saptanması. 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ Özetleri. 194, Konya 2003.
60. İça A. Sığırlarda bazı *Babesia* türlerinin indirek floresan antikor ve reverse line blotting yöntemi ile karşılaştırmalı tanısı. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2004; 1(2): 77-85.
61. Kaya G, Cakmak A, Karaer Z. Seroprevalance of theileriosis and babesiosis of cattle. Medycyna Wet 2006; 62 (2): 156-158.
62. Çakmak A, Öz İ. Adana yöresi sığırlarında kan protozoonlarının serodiagnozu. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1993;40 (1): 70-77.
63. Rijpkema SG, Molkonboer MJ, Schouls LM, et al. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* Sensulato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterisation of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. J Clin Microbiol 1995; 33: 3091-3095.
64. Gubbels MJ, De Vos S, Van Der Weide M, Viseras J, Schouls LM, De Vries E, Jongejan F. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species using reverse line blotting hybridization. J. Clin. Microbiol 1999; 37: 1782-1789.
65. Schnittger L, Yin H, Qi B, et al. Simultaneous detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasites infecting small ruminants by reverse line blotting. Parasitol Res 2004; 92: 189-196.

66. Tanyüksel M, Vatansever Z, Karaer Z, ve ark. Sığır babesiosisinin epidemiyolojisi ve zoonotik önemi. T Parazitol Derg 2002; 26 (1): 42-47.
67. İça A, İnci A, Yıldırım A. Parasitological and molecular prevalence of bovine *Theileria* and *Babesia* species in the vicinity of Kayseri. Turk J Vet Anim Sci 2007; 31: 33-38.
68. İca A, Vatansever Z, Yıldırım A, et al. Detection of *Theileria* and *Babesia* species in ticks collected from cattle. Vet Parasitol 2007; 148(2): 156-160.
69. İnci A, İça A, Florin-Christensen M, Vatansever Z, Yıldırım A, Düzlü Ö, Mosqueda J, Yavuz A. Türkiye'nin çeşitli yörelerinden elde edilen *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina*'nın moleküler karakterizasyonu. XV. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Kayseri ve Ürgüp, 18-23 Kasım 2007, ss 163-164.
70. Altay K, Aydın MF, Dumanlı N, et al. Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. Vet Parasitol 2008; 158: 295-301.
71. Mahoney DF. *Babesia* of domestic animals. In: Kreier JP (ed), Parasitic Protozoa. New York, Academic Press 1977; pp 1-52.
72. Levine ND. Veterinary Protozoology. Iowa State University Press Ames, 1th Edition 1985; pp 291-312.
73. Jack RM, Ward PA. Organ and vascular pathology of babesiosis. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press 1981; pp 459-470.
74. Wright IG, Goodger BV. Pathogenesis of Babesiosis. In: Ristic M (ed), Babesiosis of Domestic Animals and Man. Boca Raton, Florida, CRC Press 1988; pp 99-118.
75. Sonenshine DE. Biology of Ticks. Newyork, Oxford, Oxford University Press Vol. II, Chapter V 1993.
76. Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, et al. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. Clin Microbiol Rev 2003; 16(4): 622-636.
77. Clark IA, Jacobson LS. Do babesiosis and malaria share a common disease process? Ann Trop Med Parasitol 2005; 92 (4): 483-488.
78. Zintl A, Gray JS, Skerrett HE, et al. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. Parasite Immunol 2005; 27 (4): 115-120.
79. İnci A. Ankara'nın Çubuk ilçesinde sığırlarda babesiosis'in seroinsidensi üzerine araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1992; 39(1-2): 153-167.

80. Düzgün A, Alabay M, Çerçi H, ve ark. A serological study for babesiosis in cattle in Turkey using the ELISA test. IAEA-TECDOC-657 1991; pp 175-177.
81. Bilgin Z. Trakya’da sığırlarda bulunan Theileria ve Babesia türlerinin ve bunların sığırlarda yaygınlığının reverse line blooting (RLB) tekniği ile araştırılması, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2007.
82. Gün H, Tanyüksel M, Yukarı BA, ve ark. Türkiye’de babesiosisin ilk insan serodiyagnozu. T Parazit Derg 1996; 20 (1): 1-7.
83. Düzlü Ö, İnci A, Yıldırım A. Karadeniz Bölgesi’ndeki Sığırlardan Elde Edilen Babesia bovis Suşlarının Moleküler Karakterizasyonu. Kayseri: ERÜ Sağ Bil Derg 2011; 20(1): 18-28.
84. Yavuz A. Marmara ve Ege Bölgesi’ndeki sığırlardan elde edilen Babesia bovis suşlarının moleküler karakterizasyonu, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2010.
85. Hunfeld KP, Hildebrandt A, Gray JS. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. Int J Parasitol 2008; 38: 1219-1237.
86. Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford III SR, et al. Babesiosis. Clin Microbiol Rev 2000; 13(3): 451-469.
87. Mimioğlu M, Ulutaş M, Güler S. Yurdumuz sığırlarında theileriosis etkenleri ve diğer kan parazitleri. Ajans-Türk Matbaacılık Sanayi, Ankara 1971.
88. Minami T, Ishira T. Babesia ovate sp. n. isolated from cattle in Japan. Nat Inst of Anim Hlth Quarterly 1980; 20: 101-113.
89. Beyer TV, Svezhova NV, Radchenko AI, et al. Parasitophorous vacuole: morphofunctional diversity in different coccidian genera (a short insight into the problem). Cell Biol Int 2002; 26 (10): 861-871.
90. Crawford MJ, Fraunholz MJ, Roos DS. Energy Metabolism in the Apicomplexa. In: Marr JJ, Nilsen TW, Komuniecki RW (eds), Molecular Medical Parasitology. Academic Press, London, UK 2003; pp 154-171.
91. Skotarczak B. Babesiosis of human and domestic dog; ethiology, pathogenesis, diagnostics. Wiad Parazytol 2007; 53 (4): 271-280.
92. Kim C, Alhassan A, Verdida RA, et al. Development of two immunochromatographic tests for the serodiagnosis of bovine babesiosis. Vet Parasitol 2007; 148 (2): 137-143.

93. Böse R, Jorgensen WK, Dalgliesh RJ, Friedhoff KT, De Vos AJ. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol* 1995; 57: 61-74.
94. Rosenblatt JE. Laboratory diagnosis of infections due to blood and tissue parasites. *Clin Infect Dis* 2009; 49(7):1103-1108.
95. Todorovic RA, Carson CA. Methods for measuring the immunological response to *Babesia*. In: Ristic M, Kreier JP (eds), *Babesiosis*. New York, Academic Press 1981; pp 381-409.
96. Rehbein G, Heidrich-Joswig S. Use of schizont and piroplasm antigens of *Babesia equi* in the indirect fluorescent antibody and complement fixation tests. *Vet Parasitol* 1983; 12(2):135-144.
97. Weiland G. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Vet Parasitol* 1986; 20(1-3):43-48.
98. Singh H, Mishra AK, Rao JR, et al. Comparison of indirect fluorescent antibody test (IFAT) and slide enzyme linked immunosorbent assay (SELISA) for diagnosis of *Babesia bigemina* infection in bovines. *Trop Anim Health Prod* 2009; 41(2):153-9.
99. Urdaz-Rodríguez JH, Fosgate GT, Waghela SD, et al. Seroprevalence estimation and management factors associated with high herd seropositivity for *Babesia bovis* in commercial dairy farms of Puerto Rico. *Trop Anim Health Prod* 2009; 41(7):1465-1473.
100. Cantu CA, Ortega-S JA, García-Vázquez Z, et al. Epizootiology of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in free-ranging white-tailed deer in northeastern Mexico. *J Parasitol* 2009; 95(3):536-542.
101. Ferreri L, Benitez D, Dominguez M, et al. Water buffalos as carriers of *Babesia bovis* in Argentina. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1149:149-151.
102. Silva MG, Henriques G, Sánchez C, et al. First survey for *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in cattle from Central and Southern regions of Portugal using serological and DNA detection methods. *Vet Parasitol* 2009; 166(1-2):66-72.
103. Altangerel K, Alhassan A, Iseki H, et al. Evaluation of *Babesia bigemina* 200 kDa recombinant antigen in enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasitol Res* 2009;105(1):249-254.
104. Criado-Fornelio A. A review of nucleic-acid-based diagnostic tests for *Babesia* and *Theileria*, with emphasis on bovine piroplasms. *Parassitologia* 2007; 49 Suppl 1:39-44.

105. Lau AO, Tibbals DL, McElwain TF. *Babesia bovis*: the development of an expression oligonucleotide microarray. *Exp Parasitol* 2007; 117(1):93-98.
106. Liu Q, Zhou YQ, Zhou DN, et al. Semi-nested PCR detection of *Babesia orientalis* in its natural hosts *Rhipicephalus haemaphysaloides* and buffalo. *Vet Parasitol* 2007; 143(3-4): 260-266.
107. Iseki H, Alhassan A, Ohta N, et al. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *J Microbiol Methods* 2007; 71(3):281-287.
108. Kledmanee K, Suwanpakdee S, Krajangwong S, et al. Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon canis* in canine blood. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009; 40(1):35-39.
109. Kim C, Iseki H, Herbas MS, et al. Development of TaqMan-based real-time PCR assays for diagnostic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77(5):837-841.
110. Ica A, Vatansever Z, Yildirim A, et al. Investigation of ovine blood protozoa by reverse line blotting in the Kayseri region. 2. *Babesia* World Summit, Palermo, Italy, *Parassitologia* 2007a; 49 (1): 90.
111. Altay K, Aktas M, Dumanli N, et al.. Evaluation of a PCR and comparison with RLB for detection and differentiation of *Theileria* sp. MK and other *Theileria* and *Babesia* species of small ruminants. *Parasitol Res* 2008; 103: 319-323.
112. Laughery JM, Lau AO, White SN, et al. *Babesia bovis*: transcriptional analysis of rRNA gene unit expression. *Exp Parasitol* 2009; 123(1):45-50.
113. Suarez CE, McElwain TF. Stable expression of a GFP-BSD fusion protein in *Babesia bovis* merozoites. *Int J Parasitol* 2009; 39(3): 289-297.
114. Sparagano O, Loria GR, Gubbels MJ, et al. Integrated molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species of cattle in Italy. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 916: 533-539.
115. Georges K, Loria GR, Riili S, et al. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet. Parasitol* 2001; 99: 273-286.
116. García-Sanmartín J, Nagore D, García-Pérez AL, et al. Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays. *BMC Vet Res* 2006; 9: 2-16.

117. Almeria S, Castella J, Ferrer D, et al. Reverse line blot hybridization used to identify hemoprotozoa in Minorcan cattle. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 969: 78-82.
118. Almeria S, Delgado-Neira Y, Adelantado C, et al. Mediterranean theileriosis and other tick transmitted piroplasmoses in cattle in Minorca (Balearic Islands, Spain): the effect of tick control on prevalence levels analyzed by reverse line blot (RLB) macroarrays. *J Parasitol* 2009; 95(3): 598-603.
119. Luo J, Yin H, Liu Z, et al. Molecular phylogenetic studies on an unnamed bovine *Babesia* sp. based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Vet Parasitol* 2005; 133(1):1-6.
120. Liu Q, Zhao JL, Zhou YQ, et al. Study on some molecular characterization of *Babesia orientalis*. *Vet Parasitol* 2005; 130(3-4):191-198.
121. Martins TM, Neves L, Pedro OC, et al. Molecular detection of *Babesia* spp. and other haemoparasitic infections of cattle in Maputo Province, Mozambique. *Parasitology* 2010;4:1-8.
122. Wilkowsky SE, Farber M, Echaide I, et al. *Babesia bovis* merozoite surface protein-2c (MSA-2c) contains highly immunogenic, conserved B-cell epitopes that elicit neutralization-sensitive antibodies in cattle. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 127(2):133-141.
123. Blackman MJ, Bannister LH. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol Biochem Parasitol* 2001; 117: 11-25.
124. Ruef BJ, Dowling SC, Conley PG, et al. A unique *Babesia bovis* spherical body protein is conserved among geographic isolates and localizes to the infected erythrocyte membrane. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 105: 1-12.
125. Cowman AF, Bernard O, Stewart N, et al. Genes of the protozoan parasite *Babesia bovis* that rearrange to produce RNA species with different sequences. *Cell* 1984; 37 (2): 653-660.
126. Mishra VS, McElwain TF, Dame JB, et al. Isolation, sequence and differential expression of the p58 gene family of *Babesia bigemina*. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 53 (1-2): 149-158.
127. James MA. Application of exoantigens of *Babesia* and *Plasmodium* in vaccine development. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83: 67-72.
128. Carcy B, Précigout E, Schetters T, et al. Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity. *Vet Parasitol* 2006;138 (1-2): 33-49.

129. Fleige T, Fischer K, Ferguson DJ, et al. Carbohydrate metabolism in the *Toxoplasma gondii* apicoplast: localization of three glycolytic isoenzymes, the single pyruvate dehydrogenase complex, and a plastid phosphate translocator. *Eukaryot Cell* 2007; 6 (6): 984-996.
130. Wilkowsky SE, Farber M, Gil G, et al. Molecular characterization of *Babesia bovis* strains using PCR restriction fragment length polymorphism analysis of the *msa2-a/b* genes. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1149:141-144.
131. Zupańska AK, Drummond PB, Swetnam DM, et al. Universal primers suitable to assess population dynamics reveal apparent mutually exclusive transcription of the *Babesia bovis* *ves1alpha* gene. *Mol Biochem Parasitol* 2009; 166(1):47-53.
132. Borgonio V, Mosqueda J, Genis AD, et al. *msa-1* and *msa-2c* gene analysis and common epitopes assessment in Mexican *Babesia bovis* isolates. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1149:145-148.
133. Genis AD, Mosqueda JJ, Borgonio VM, et al. Phylogenetic analysis of Mexican *Babesia bovis* isolates using *msa* and *ssrRNA* gene sequences. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1149: 121-125.
134. Genis AD, Perez J, Mosqueda JJ, et al. Using *msa-2b* as a molecular marker for genotyping Mexican isolates of *Babesia bovis*. *Infect Genet Evol* 2009; 9(6):1102-1107.
135. Brown WC, Norimine J, Goff WL, et al. Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. *Parasite Immunol* 2006; 28(7): 315-327.
136. Mosqueda J, McElwain TF, Stiller D, et al. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. *Infect Immun* 2002; 70(3):1599-1603.
137. Suarez CE, McElwain TF. Transfection systems for *Babesia bovis*: a review of methods for the transient and stable expression of exogenous genes. *Vet Parasitol* 2010; 167(2-4): 205-215.
138. Dominguez M, Echaide I, Echaide ST, et al. In silico predicted conserved B-cell epitopes in the merozoite surface antigen-2 family of *B. bovis* are neutralization sensitive. *Vet Parasitol* 2010; 167(2-4):216-226.
139. Leroith T, Brayton KA, Molloy JB, et al. Sequence variation and immunologic cross-reactivity among *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 proteins from vaccine strains and vaccine breakthrough isolates. *Infect Immun* 2005; 73(9):5388-5394.

140. Berens SJ, Brayton KA, Molloy JB, et al. Merozoite surface antigen 2 proteins of *Babesia bovis* vaccine breakthrough isolates contain a unique hypervariable region composed of degenerate repeats. *Infect Immun* 2005; 73(11):7180-7189.
141. Bono MF, Mangold AJ, Baravalle ME, et al. Efficiency of a recombinant MSA-2c-based ELISA to establish the persistence of antibodies in cattle vaccinated with *Babesia bovis*. *Vet Parasitol* 2008; 157(3-4):203-210.
142. Kuttler KL, Gipson CA, Goff WL, et al. Experimental *Babesia equi* infection in mature horses. *Am J Vet Res* 1986; 47 (8): 1668-1670.
143. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 95-125.
144. Criado-Fornelio A, Buling A, Asenzo G, Benitez D, Florin-Christensen M, Gonzalez-Oliva A, Henriques G, Silva M, Alongi A, Agnone A, Torina A, Madruga CR. Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids. *Vet Parasitol* 2009; 162:200-206.
145. Ramos CA, Araújo FR, Souza II, Bacanelli G, Luiz HL, Russi LS, Oliveira RH, Soares CO, Rosinha GM, Alves LC. Real-time polymerase chain reaction based on msa2c gene for detection of *Babesia bovis*. *Vet Parasitol* 2011; 176(1):79-83.
146. Guerrero FD, Bendele KG, Davey RB, George JE. Detection of *Babesia bigemina* infection in strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from outbreaks in south Texas. *Vet Parasitol* 2007; 145(1-2):156-63.
147. Albayrak AS, Eroğlu A, Kalaycı Ş, Küçüksille E, Ak B, Karaatlı M, ve ark. Güvenirlilik Analizi. Kalaycı Ş (ed), SPSS Uygulamalı Çok Değişkenli İstatistik Teknikleri. Asil yayın dağıtım, Ankara 2005.
148. Nari A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Vet Parasitol* 1995; 57: 153-165.
149. Oura CA, Bishop RP, Wampande EM, et al. Application of a reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda. *Int J Parasitol* 2004; 34(5):603-613.
150. Randal K, Saiki BS, Chu-an chan PD, Corey H, Levenson PD. et al. Diagnosis of sickle cell anemia and β Thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradio active allekspezifc oligonucleotide probes. *N. Engl. J. Med.* 1988, 309 (9): 537-541

151. Rijpkema SG, Molkenboer MJ, Schouls LM, Jongejan F, Schelekens JF. Simultaneous detection and genotyping of three genomic group of *Borrelia burgdoferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and '3 S rRNA genes. J. Clin. Microbiol 1995; 33: 3091-3095
152. Kamerbeek J, Schouls L, Kalk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D. et al. Simultaneous detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997; 35 (4): 907-914
153. Kim DM, Park G, Kim HS, Lee JY, Neupane GP, Graves S, Stenos J. Comparison of conventional, nested, and real-time quantitative PCR for diagnosis of scrub typhus. J Clin Microbiol. 2011; 49(2):607-12.
154. AbouLaila M, Yokoyama N, Igarashi I. Development and evaluation of two nested PCR assays for the detection of *Babesia bovis* from cattle blood. Vet Parasitol. 2010; 172(1-2):65-70.
155. Terkawi MA, Huyen NX, Shinuo C, Inpankaew T, Maklon K, Aboulaila M, Ueno A, Goo YK, Yokoyama N, Jittapalapong S, Xuan X, Igarashi I. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. Vet Parasitol 2011.
156. Hartelt K, Oehme R, Frank H, Brockmann SO, Hassler D, Kimmig P. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. Int J Med Microbiol 2004; 37:86-92.
157. Calder JA, Reddy GR, Chieves L, Courtney CH, Littell R, Livengood JR, Norval RA, Smith C, Dame JB. Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. J Clin Microbiol 1996; 34(11): 2748-55.
158. Oliveira-Sequeira TC, Oliveira MC, Araujo JP Jr, Amarante AF. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. Int J Parasitol 2005; 35(1):105-11.
159. Sam-Yellowe T.Y. Rhoptry organelles of the apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. Parasitol Today 1996; 12(8): 308-316.
160. Dalrymple B.P., Casu R.E., Peters J.M., Dimmock C.M., Gale K.R., Boese R. Wright IG. Characterisation of a family of multi-copy genes encoding rhoptry protein homologues in

- Babesia bovis*, *Babesia ovis* and *Babesia canis*. Mol Biochem Parasitol 1993; 57 (2): 181-192.
161. Kappmeyer LS, Perryman LE, Hines SA., Baszler TV, Katz JB, Hennager SG, Knowles DP . Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* by recombinant *B. caballi* rhoptry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1999; 37(7): 2285–2290.
 162. Skuce PJ, Mallon TR, Taylor SB. Molecular cloning of a putative rhoptry protein homologue from *Babesia divergens*. Mol Biochem Parasitol 1996; 77 (1): 99–102.
 163. Suarez CE, Palmer GH, Hötzel I, McElwain TF. Structure, sequence, and transcriptional analysis of the *Babesia bovis* rap-1 multigene locus. Mol Biochem Parasitol 1998; 93 (2): 215-222.
 164. Ikadai H, Xuan X, Igarashi I, Tanaka S, Kanemaru T, Nagasawa H, Fujisaki K, Suzuki N, Mikami T. Cloning and expression of a 48-kilodalton *Babesia caballi* merozoite rhoptry protein and potential use of the recombinant antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1999; 37(11): 3475-3480.
 165. Machado RZ, McElwain TF, Pancraccio HP, Freschi CR, Palmer GH. *Babesia bigemina*: immunization with purified rhoptries induces protection against acute parasitemia. Exp Parasitol 1999; 93 (2): 105-108.
 166. Yokoyama N, Okamura M, Igarashi I. Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. Vet Parasitol 2006; 138 (1-2): 22-32.